



Identification et caractérisation de nouveaux facteurs
d'assemblage du protéasome 26S chez la levure
Saccharomyces cerevisiae

Benoît Le Tallec

► To cite this version:

Benoît Le Tallec. Identification et caractérisation de nouveaux facteurs d'assemblage du protéasome 26S chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Paris Sud - Paris XI, 2008. Français. NNT: . tel-00333135

HAL Id: tel-00333135

<https://theses.hal.science/tel-00333135>

Submitted on 22 Oct 2008

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE
Présentée par

Benoît LE TALLEC

Pour obtenir le titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS-SUD 11
Spécialité : Biologie et Génétique Moléculaire

Ecole doctorale Gènes, Génomes, Cellules

**Identification et caractérisation de nouveaux facteurs
d'assemblage du protéasome 26S chez la levure
*Saccharomyces cerevisiae***

N° d'ordre : 9129

Date de soutenance : 22 septembre 2008

Jury MM.

Giuseppe BALDACCI
Olivier COUX
Rosine HAGUENAUER-TSAPIS
Agnès DELAHODDE
Claudie LAMOUR-Isnard
Carl MANN
Anne PEYROCHE

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur
Directeur de thèse

Laboratoire du Métabolisme de l'ADN et de Réponse aux Génotoxiques
DSV/iBiTec-S/SBIGeM – CEA Saclay

A Brice, pour qui.
A Anne, Bénédicte et Régis, sans qui.

Now, whether it be
Bestial oblivion, or some craven scruple
Of thinking too precisely on the event,
A thought which, quarter'd, hath but one part wisdom
And ever three parts coward, I do not know
Why yet I live to say 'This thing's to do;'
Sith I have cause and will and strength and means
To do't.

William Shakespeare, Hamlet, Acte IV, scène 4.

Résumé

Les checkpoints de l'ADN coordonnent les réponses cellulaires aux dommages de l'ADN et au blocage de la réplication des cellules eucaryotes. Chez *Saccharomyces cerevisiae*, la protéine kinase Rad53 occupe une place centrale au sein des checkpoints de l'ADN. Afin d'identifier de nouveaux partenaires de Rad53, une approche génétique a été développée, utilisant l'allèle dominant létal *RAD53-DL* qui déclenche constitutivement des réponses cellulaires normalement induites par des lésions de l'ADN. Notre hypothèse est que l'absence des activateurs ou des substrats de Rad53 pourrait rétablir la croissance. Nous avons donc recherché, à l'échelle du génome de *S. cerevisiae*, les gènes qui suppriment la toxicité de *RAD53-DL* lorsqu'ils sont inactivés. 110 gènes ont été isolés et classés en groupes fonctionnels. Un groupe a particulièrement retenu notre attention. Il est composé de huit gènes dont l'inactivation confère à la cellule une hyper-résistance à plusieurs stress génotoxiques. Trois de ces gènes codent des composants du protéasome 26S, l'enzyme central du système de dégradation ubiquitine-dépendante des protéines qui joue un rôle crucial dans la plupart des processus cellulaires. Le protéasome est une structure macromoléculaire très sophistiquée composée d'une partie catalytique, la particule 20S, associée au complexe régulateur 19S, lui-même formé de 2 sous-complexes, la base et le couvercle. Son assemblage comprend de nombreuses étapes ordonnées. Au moment du crible, un seul chaperon du protéasome était connu chez la levure, la protéine Ump1, impliquée dans les étapes finales de maturation du protéasome 20S. Par des analyses génétiques et biochimiques, nous avons caractérisé les cinq autres membres du groupe fonctionnel « protéasome », dont la fonction était jusqu'alors inconnue. Les gènes *YLR021W*, *YPL144W*, *YLR199C* et *YKL206C*, que nous avons baptisés *POC1-4* (Protéasome Chaperone), codent 4 protéines formant deux paires de chaperons du protéasome 20S (Poc1-Poc2 et Poc3-Poc4) agissant en amont de Ump1. *HSM3* code la première protéine chaperonne de la particule régulatrice du protéasome. Hsm3 s'associe avec la base du 19S et assiste son assemblage. Son rôle est également de réguler l'association du 19S en formation avec le protéasome 20S. Nous avons identifié les homologues mammifères de Poc1-4 (PAC1-4) et Hsm3 (S5b), mettant ainsi en lumière une conservation remarquable des facteurs d'assemblage du protéasome au cours de l'évolution.

Mot-clés : Rad53, checkpoints, dommages de l'ADN, hyper-résistance, protéasome, assemblage, chaperon, Ump1, Poc, PAC, Hsm3, S5b.

Abstract

DNA checkpoints are activated upon detection of DNA damage or replication blocks and coordinate several processes of the DNA damage response. In *Saccharomyces cerevisiae*, Rad53 protein kinase plays a key role in DNA checkpoints. A genetic approach has been developed in our laboratory to identify positive regulators and new substrates of Rad53, using a dominant-lethal form of *RAD53*, *RAD53-DL*, which triggers physiological events normally induced by DNA damage. We reasoned that *RAD53-DL* toxicity should be reduced in the absence of Rad53 activators or substrates. Therefore, we carried out a genome-wide screen for genes whose deletion could suppress *RAD53-DL* toxicity. 110 suppressor genes have been isolated and classified into functional groups. We further analyzed one of these groups, which is made of 8 genes that lead to hyperresistance to genotoxic stress when they are inactivated. Three genes encode components of the 26S proteasome, the central enzyme of ubiquitin-dependant proteolysis that plays crucial roles in most essential cellular processes. Proteasome is a highly sophisticated macromolecular structure that comprises the catalytic core particle (20S) and the regulatory particle (19S), itself composed of two subcomplexes, the base and the lid. Its assembly proceeds in a multistep and orderly fashion. At the time of our screen, only one proteasome chaperone was well-described in yeast, Ump1, which participates in the final stages of 20S proteasome maturation. By combining genetical and biochemical analyses, we have assigned a molecular function to the five other members of the “proteasome” functional group, which were previously uncharacterized. *YLR021W*, *YPL144W*, *YLR199C* and *YKL206C* genes, which we have named *POC1-4* (Proteasome Chaperone), encode 4 proteins that form two pairs of chaperones of the 20S proteasome (Poc1-Poc2 and Poc3-Poc4) acting upstream of Ump1. *HSM3* encodes the first chaperone protein of the regulatory particle. Hsm3 associates with the base subcomplex of the 19S and is specifically required for its assembly. Hsm3 also modulates the association between the nascent 19S and the 20S proteasome. We have identified functional mammalian homologs of yeast Poc1-4 (PAC1-4) and Hsm3 (S5b) and provided evidence for a remarkable conservation of a chaperone-assisted proteasome assembly throughout evolution.

Keywords : Rad53, checkpoints, DNA damage, hyperresistance, proteasome, assembly, chaperone, Ump1, Poc, PAC, Hsm3, S5b.

Note au lecteur

Bien sûr, le déroulement de toute thèse est particulier, le cheminement scientifique toujours sinueux. Mais partir d'un crible génétique visant à identifier de nouveaux partenaires de la protéine des checkpoints de l'ADN Rad53 pour étudier finalement des facteurs d'assemblage du protéasome, voilà qui est pour le moins inattendu. Surprenant. Captivant. Telle est la magie de la biologie. Nous ne pouvions que lui rendre hommage et détailler le crible réalisé. Que le lecteur ne soit donc pas surpris de trouver dans l'introduction deux parties distinctes, la première présentant brièvement les checkpoints de l'ADN, la deuxième consacrée au cœur de notre étude, le protéasome. Les liens avérés ou hypothétiques entre les checkpoints et le protéasome seront discutés à la fin du manuscrit.

Les résultats obtenus au cours de ces quatre années seront en partie exposés directement sous la forme d'articles en anglais, l'un publié, l'autre soumis. Les souches, plasmides et techniques utilisés au cours de ma thèse sont décrits dans les sections « Matériel et Méthodes » de ces deux articles.

Enfin, le lecteur voudra bien nous pardonner pour les expressions latines, anglaises et autres anglicismes utilisés, reflets d'une déformation scientifico-jargonneuse de la langue de Molière. Nous aspirons également à sa clémence pour les quelques « coquilles » disséminées dans le manuscrit, qui auront échappé à nos vigilantes relectures.

Un lecteur averti en vaut deux. Nous vous souhaitons une très bonne lecture.

Table des matières

TABLE DES FIGURES	21
INTRODUCTION	25
1ERE PARTIE : LA PROTEINE KINASE RAD53 ET LES CHECKPOINTS DE L'ADN CHEZ <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	27
1. Prélude	27
1.1. Le cycle cellulaire	27
1.1.1 Les quatre phases du cycle cellulaire	27
1.1.2 Le contrôle du cycle cellulaire	28
1.2 Les checkpoints	29
1.2.1 Du chekpoint mitotique...	29
1.2.2 ...aux mécanismes de surveillance de l'ADN	30
1.3 Fin du prélude	31
2. Organisation générale des checkpoints de l'ADN	31
2.1 Protéines senseurs	32
2.1.1 Kinases de type ATM/ATR	32
2.1.2 Complexes de type RFC et PCNA	33
2.1.3 Signal de recrutement des protéines senseurs	33
2.2 Protéines kinases effectrices	34
2.3 Adaptateurs	35
2.4 La protéine kinase Rad53	36
2.4.1 Identification	36
2.4.2 Description	37
2.4.3 Sites de phosphorylation de Rad53	37
3. Mécanismes d'action des checkpoints de l'ADN	38
3.1 Arrêts du cycle cellulaire	38
3.1.1 Arrêt à la transition G1/S	38
3.1.2 Arrêt à la transition G2/M	39
3.1.2.1 <i>L'arrêt décisif ?</i>	39
3.1.2.2 <i>Mécanisme de l'arrêt G2/M</i>	40
3.2 Checkpoints de la phase S	41
3.2.1 Checkpoint intra-S et checkpoint réplication	41
3.2.2 Suppression du démarrage des origines tardives de réplication	41
3.2.3 Maintien de l'intégrité des fourches	42
3.3 Apoptose	42
3.4 Activation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle des systèmes de réparation	42
3.4.1 Activation transcriptionnelle des systèmes de réparation	43
3.4.2 Régulation post-transcriptionnelle des systèmes de réparation	43
3.5 Régulation de la ribonucléotide réductase	44
3.5.1 Mécanismes de régulation	44
3.5.2 Concentration en dNTP et résistance aux dommages	44
3.6 Remodelage de la chromatine	45
3.7 Inactivation des checkpoints : rétablissement et adaptation	46
3.7.1 Rétablissement	47
3.7.2 Adaptation	47

4. Rad53 et la régulation des histones	48
4.1 Rad53 et Asf1	48
4.2 Rad53 et les histones	48
5. Checkpoints, stabilité génomique et cancer	49
6. Conclusion	49
 2EME PARTIE : LE PROTEASOME 26S : ASSEMBLAGE ET FONCTIONNEMENT	 51
1. Prélude	51
1.1 Du lysosome...	51
1.2 ...au système ubiquitine-dépendant de dégradation protéique...	52
1.3 ...au système ubiquitine-protéasome	53
1.4 Fin du prélude	54
2. Ubiquitine et dégradation protéique ubiquitine-dépendante	55
2.1 L'ubiquitine	55
2.2 L'ubiquitinylation	56
2.2.1 Conjugaison de l'ubiquitine au substrat	56
2.2.2 Diversité ET spécificité de l'ubiquitinylation	58
2.2.3 Régulation de l'ubiquitinylation	58
2.2.4 L'ubiquitine, un signal multifonctionnel	59
3. Protéasome 26S	61
3.1 Généralités	61
3.2 Protéasome 20S	62
3.2.1 Structure du protéasome 20S	62
3.2.2 Chambre catalytique du protéasome 20S	63
3.2.3 Accès à la chambre catalytique du protéasome 20S eucaryote	63
3.2.4 Antichambres du protéasome 20S	64
3.2.5 Structure des sous-unités du protéasome 20S	65
3.2.6 Sous-unités alternatives du protéasome 20S	66
3.3 Complexe régulateur 19S	66
3.3.1 Composition du complexe régulateur 19S	68
3.3.2 Conservation des sous-unités du 19S chez les eucaryotes	69
3.3.3 Similitudes et différences du 19S et des complexes régulateurs procaryotes	70
3.3.4 Organisation du complexe régulateur 19S	71
3.3.4.1 <i>Données de microscopie électronique</i>	71
3.3.4.2 <i>A la recherche de l'organisation du 19S</i>	71
3.3.4.2.1 Organisation de la base	72
3.3.4.2.2 Organisation du couvercle	72
3.3.4.2.3 Organisation du 19S	73
3.3.4.2.4 Interactions 19S-20S	74
3.4 Autres complexes régulateurs du protéasome 20S	74
3.5 Assemblage du protéasome 26S	75
3.5.1 Assemblage du protéasome 20S	75
3.5.1.1 <i>Formation de l'anneau α</i>	76
3.5.1.1.1 Un auto-assemblage ?	76
3.5.1.1.2 Les protéines chaperonnes PAC1 et PAC2	77
3.5.1.2 <i>Formation des hémiprotéasomes</i>	79
3.5.1.2.1 Composition des hémiprotéasomes	79

3.5.1.2.2 Fonction(s) des propeptides des sous-unités β	79
3.5.1.2.3 Fonction(s) des extensions C-terminales des sous-unités β	81
3.5.1.3 <i>Dimérisation des hémiprotéasomes</i>	81
3.5.1.3.1 Couplage de la dimérisation et du clivage des précurseurs	81
3.5.1.3.2 Clivage autocatalytique des précurseurs	82
3.5.1.3.3 Ump1, LE chaperon du protéasome 20S	83
3.5.1.3.4 Rôle(s) de $\beta 7$	84
3.5.1.3.5 Autres facteurs intervenant dans la maturation du protéasome 20S	85
3.5.1.4 <i>Importation nucléaire et maturation du protéasome 20S</i>	86
3.5.1.5 <i>Schéma général de l'assemblage du protéasome 20S</i>	87
3.5.2 Assemblage du complexe régulateur 19S	87
3.5.2.1 <i>Assemblage de la base</i>	88
3.5.2.2 <i>Assemblage du couvercle</i>	89
3.5.2.3 <i>Indépendance de l'assemblage de la base et du couvercle</i>	91
3.5.2.4 <i>Importation nucléaire et assemblage du complexe régulateur 19S</i>	91
3.5.2.4.1 Importation nucléaire de la base	91
3.5.2.4.2 Importation nucléaire du couvercle	92
3.5.2.4.3 Association base/couvercle	92
3.5.3 Formation du protéasome 26S	93
3.5.3.1 <i>Association 19S-20S</i>	93
3.5.3.2 <i>Dissociation 19S-20S</i>	93
3.5.3.3 <i>Localisation du 26S</i>	94
3.5.4 Rpn4, un activateur transcriptionnel du protéasome chez <i>S. cerevisiae</i>	95
3.6 Mécanistique de la dégradation des substrats du protéasome	96
3.6.1 Dégradation ATP-dépendante	96
3.6.2 Activation du protéasome 20S	97
3.6.2.1 <i>Fermeture du pore axial du protéasome 20S</i>	97
3.6.2.2 <i>Mécanisme d'ouverture du protéasome 20S</i>	97
3.6.2.2.1 Ouverture du protéasome 20S par PA28	98
3.6.2.2.2 Ouverture du protéasome 20S par le 19S	98
3.6.2.2.3 Couplage assemblage/ouverture ?	99
3.6.2.2.4 Autres mécanismes d'ouverture du protéasome 20S	100
3.6.3 Reconnaissance du substrat polyubiquitinylé	100
3.6.3.1 <i>Récepteurs intrinsèques</i>	100
3.6.3.1.1 Rpn10/S5a	100
3.6.3.1.2 Rpt5	102
3.6.3.1.3 Rpn13	102
3.6.3.2 <i>Récepteurs extrinsèques</i>	102
3.6.3.3 <i>Un niveau de régulation supplémentaire</i>	103
3.6.3.4 <i>Autres mécanismes de reconnaissance</i>	104
3.6.4 Dépliement du substrat	105
3.6.5 Translocation du substrat	105
3.6.5.1 <i>Sur le couplage du dépliement et de la translocation</i>	105

3.6.5.2 Orientation du substrat lors de la translocation	106
3.6.5.3 Signal d'initiation de la protéolyse	107
3.6.6 Déubiquitinylation du substrat	107
3.6.6.1 Couplage déubiquitinylation/dégradation	107
3.6.6.2 Remodelage des chaînes d'ubiquitine	108
3.6.7 Dégradation du substrat	109
3.6.7.1 Considérations énergétiques	109
3.6.7.2 Vers une protéolyse totale	110
3.6.7.3 Taille des produits de dégradation	110
3.6.7.4 Sortie des produits de dégradation	111
4. Conclusion	112
RESULTATS ET DISCUSSION	113
1ERE PARTIE : REALISATION D'UN CRIBLE A L'ECHELLE DU GENOME CHEZ <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> POUR IDENTIFIER DE NOUVEAUX PARTENAIRES DE RAD53	115
1. Approche génétique	115
1.1 Introduction	115
1.2 <i>RAD53-DL</i> , un allèle dominant létal conditionnel	116
1.3 Un crible à l'échelle du génome pour identifier de nouveaux régulateurs positifs et des substrats de Rad53	117
2. De la théorie à la pratique	117
2.1 La collection de mutants EUROSCARF	118
2.2 Conception du crible	118
2.2.1 Souche appât	118
2.2.1.1 Analyses préliminaires	118
2.2.1.2 Construction de la souche appât	119
2.2.1.3 Caractérisation de la souche appât	119
2.2.2 Intégration de <i>RAD53-DL</i> dans la collection EUROSCARF	121
2.2.2.1 Toxicité de <i>RAD53-DL</i> dans une souche diploïde	122
2.2.2.2 Cassette de sélection <i>PαNAT</i>	122
2.2.2.3 Choix de la souche appât	123
2.2.2.4 Contrôle de suppression de la toxicité de <i>RAD53-DL</i>	123
2.2.3 Conclusion	124
3. Le crible en pratique	124
3.1 Conjugaison	124
3.2 Sélection des diploïdes	125
3.3 Sporulation	126
3.4 Sélection des supprimeurs de la toxicité de <i>RAD53-DL</i>	127
3.5 Contrôles du crible	128
3.6 Biais du crible	128
4. Le crible comme si vous y étiez	128
5. Analyse du crible	129
5.1 Vérification de la suppression de <i>RAD53-DL</i>	129
5.1.1 Test de croissance en gouttes	129
5.1.2 Expression de Rad53-DL	130
5.1.3 Sur l'influence de la camptothécine	131
5.2 Identification des gènes supprimeurs	132

6. Résultats du crible de suppression de <i>RAD53-DL</i>	132
6.1 Analyse des bases de données et groupes fonctionnels	133
6.1.1 Voie HOG du stress osmotique	133
6.1.2 Métabolisme de l'ARN	136
6.1.2.1 Nonsense-mediated mRNA decay	136
6.1.2.2 Polyadénylation de l'ARN	137
6.1.2.3 NMD et polyadénylation	137
6.1.3 <i>OCA1</i> , <i>YHL029C</i> et <i>YCR095C</i>	137
6.1.4 Protéasome	138
6.1.5 Conclusion	138
6.2 Analyse phénotypique des supresseurs et implication des supresseurs dans la voie de réponse aux dommages de l'ADN	139
6.2.1 Test de sensibilité des supresseurs au 4NQO, à la camptothécine et à l'hydroxyurée	139
6.2.2 Tests d'épistasie et groupes fonctionnels	139
6.3 Qui étudier ?	142
6.4 Perspectives du cribles	143
6.4.1 Autres analyses des supresseurs	143
6.4.2 Et Rad53 ?	143
 2EME PARTIE : IDENTIFICATION ET CARACTERISATION DE NOUVEAUX FACTEURS D'ASSEMBLAGE DU POROTEASOME 26S CHEZ <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	 147
1. Introduction	147
2. L'assemblage du protéasome 20S est orchestré par 2 paires de protéines chaperonnes chez la levure et chez les mammifères	147
2.1 Article, figures et discussion supplémentaires	149
2.2 Poc3-Poc4 et PAC3/PAC4 : données récentes	181
2.2.1 Formation de l'anneau α	181
2.2.2 Décrochage de Poc3-Poc4	182
2.2.3 Comparaison de Poc3-Poc4 avec PAC3	182
2.2.4 Structure de l'hétérodimère Poc3-Poc4	183
2.2.5 Conclusion	183
3. Hsm3/S5b contrôle l'assemblage du complexe régulateur 19S du protéasome	185
Article et figures supplémentaires	185
 3EME PARTIE : PROTEASOME ET REPOSE AUX DOMMAGES DE L'ADN	 231
1. Des phénotypes liés au protéasome 26S ?	231
2. Rad53 et le protéasome	232
2.1 Rad53, une cible du protéasome ?	232
2.2 Le protéasome, une cible de Rad53 ?	233
3. Pourquoi tant de résistance ?	234
3.1 Moins de dommages de l'ADN?	234
3.2 Un ralentissement du cycle ?	234
3.3 Protéasome et systèmes de réparation de l'ADN	235
3.3.1 Protéasome et réparation par excision de nucléotide	236
3.3.2 Protéasome et recombinaison homologue	236
3.3.3 UPS et synthèse translesionnelle	238

3.3.4 Réparation des mésappariements de bases et résistance aux dommages de l'ADN	239
3.3.5 Autres systèmes de réparation	240
3.4 Autres hypothèses	240
3.5 Sensibilité au stress génotoxique des mutants <i>rpn4Δ</i>	241
4. Conclusion	241
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	243
BIBLIOGRAPHIE	247
REMERCIEMENTS	291

Table des figures

INTRODUCTION

1ERE PARTIE

Figure I 1. Le cycle cellulaire des cellules eucaryotes	27
Figure I 2. Vue générale de la régulation du cycle cellulaire par les complexes cyclines-CDK	28
Figure I 3. Les checkpoints de l'ADN	30
Figure I 4. Modèle d'activation des checkpoints de l'ADN chez <i>S. cerevisiae</i> selon la phase du cycle et le type de stress	32
Tableau I 1. Les protéines des checkpoints de l'ADN chez les eucaryotes	33
Figure I 5. Modèle d'activation de Rad53	35
Figure I 6. Modèle d'activation des checkpoints en réponse aux dommages de l'ADN chez <i>S. cerevisiae</i>	36
Figure I 7. La protéine kinase Rad53 et ses sites de phosphorylation	38
Figure I 8. Vue schématique de l'arrêt G2/M chez <i>S. cerevisiae</i>	40
Figure I 9. Vue schématique des mécanismes de régulation de l'activité RNR par les checkpoints de l'ADN	45
Figure I 10. Les phénomènes d'adaptation et de rétablissement	46
Figure I 11. Principales interactions de Rad53	49
Figure I 12. Réseau des interactions physiques de Rad53	50

2EME PARTIE

Figure I 13. Le système de dégradation protéique ubiquitine-dépendant des origines à nos jours	54
Figure I 14. Structure de l'ubiquitine	56
Figure I 15. Séquence des réactions enzymatiques d'ubiquitylation	57
Figure I 16. Représentation schématique de la cascade de conjugaison de l'ubiquitine	58
Tableau I 2. Types de modifications des protéines par l'ubiquitine et leurs rôles	60
Figure I 17. Processus exécutés par le protéasome 26S	61
Figure I 18. Structure du protéasome 20S de <i>S. cerevisiae</i>	62
Figure I 19. Coupe longitudinale et vue du dessus du protéasome 20S de <i>S. cerevisiae</i>	64
Figure I 20. Structure des sous-unités α et β de <i>T. acidophilum</i>	65
Tableau I 3. Nomenclatures des sous-unités du protéasome 26S eucaryote	67

Figure I 21. Représentation schématique du protéasome 26S	68
Figure I 22. Images de microscopie électronique de protéases compartimentées	70
Figure I 23. Organisation supposée de la base du 19S	73
Figure I 24. Organisation supposée du couvercle du 19S	74
Figure I 25. Formation de l'anneau α assistée par l'hétérodimère PAC1-PAC2	78
Figure I 26. Formation des complexes précurseurs 13S et 15S	80
Figure I 27. Dimérisation des hémiprotéasomes et clivage autocatalytique des précurseurs	85
Figure I 28. Assemblage du protéasome 20S eucaryote	88
Figure I 29. Modèles d'assemblage du couvercle du complexe régulateur 19S	90
Figure I 30. Modèle d'assemblage du complexe régulateur 19S chez <i>S. cerevisiae</i>	94
Figure I 31. Etapes de la dégradation des substrats polyubiquitinylés par le protéasome 26S	97
Figure I 32. Comparaison des images par microscopie électronique des complexes PAN-protéasome 20S de <i>M. jannaschii</i> et protéasome 26S de <i>Xenopus laevis</i>	99
Figure I 33. Modèle d'ouverture du protéasome 20S par le complexe régulateur 19S	101
Figure I 34. Récepteurs de l'ubiquitine chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i> et <i>Homo sapiens</i>	104

RESULTATS ET DISCUSSION

1ERE PARTIE

Figure RI 1. L'allèle dominant létal conditionnel <i>RAD53-DL</i>	116
Figure RI 2. Principe du crible supprimeur de la toxicité de <i>RAD53-DL</i>	117
Figure RI 3. Construction de la souche appât	119
Figure RI 4. Caractérisation de la souche appât	121
Figure RI 5. Contrôles de suppression de la toxicité de <i>RAD53-DL</i>	124
Figure RI 6. Schéma général du crible supprimeur de la toxicité de <i>RAD53-DL</i>	125
Figure RI 7. Sélection des diploïdes	126
Figure RI 8. Résultats du crible	130
Figure RI 9. Vérification de la suppression de la toxicité de <i>RAD53-DL</i>	131
Figure RI 10. Identification des supprimeurs	132
Tableau RI 1. Gènes dont l'inactivation supprime la toxicité de <i>RAD53-DL</i>	145
Tableau RI 2. Répartition des supprimeurs selon leur fonction cellulaire	134
Figure RI 11. <i>RAD53-DL</i> et la voie HOG de réponse au stress osmotique	135

Figure RI 12. Effet suppresseur de <i>RAD53-DL</i> et résistance au stress génotoxique des mutants du NMD	136
Figure RI 13. Interactions entre le NMD et la polyadénylation des ARN	138
Tableau RI 3. Sensibilité des suppresseurs au stress génotoxique	140
Figure RI 14. Effet suppresseur de <i>RAD53-DL</i> et sensibilité au stress génotoxique des mutants <i>oca1Δ</i> , <i>yhl029cΔ</i> et <i>ycr095cΔ</i>	141
Figure RI 15. Résistance au stress génotoxique des mutants du groupe fonctionnel « protéasome »	142
Figure RI 16. Influence de différents suppresseurs sur l'activation de Rad53 en réponse au stress génotoxique	144
2EME PARTIE	
Figures article « 20S Proteasome Assembly Is Orchestrated by Two Distinct Pairs of Chaperones in Yeast and in Mammals »	149
Figures supplémentaires article « 20S Proteasome Assembly Is Orchestrated by Two Distinct Pairs of Chaperones in Yeast and in Mammals »	164
Figure RII 1. Structure du complexe Poc3-Poc4 (Dmp2/Dmp1)	183
Figure RII 2. Rôle des protéines chaperonnes Poc3-Poc4 dans l'assemblage du protéasome 13S de <i>S. cerevisiae</i>	184
Figures article « Hsm3/S5b Controls the Assembly Pathway of the 19S Regulatory Particle of the Proteasome »	211
Figures supplémentaires article « Hsm3/S5b Controls the Assembly Pathway of the 19S Regulatory Particle of the Proteasome »	221

INTRODUCTION

1^{ère} partie : La protéine kinase Rad53 et les checkpoints de l'ADN chez *Saccharomyces cerevisiae*

1. Prélude

L'image d'une cellule en train de se diviser est la première qui me vient à l'esprit quand je pense à la biologie. Réminiscence de l'école, nostalgie... peut-être. Un grand mystère, aussi. Les cellules se divisent, c'est entendu. Mais comment ? Que se passe-t-il entre deux divisions ? D'autres, évidemment, se sont déjà posé la question. Leland Hartwell, Paul Nurse et Timothy Hunt, en particulier. Qui ont apporté des réponses. Qui ont comblé, petit à petit, le fossé de l'entre-divisions. Qui ont reçu, pour cela, le Prix Nobel de Médecine en 2001. Alors ? Entre deux divisions, la cellule se prépare. De façon ordonnée, contrôlée, par étapes. Et à quoi se prépare-t-elle ? A se diviser, évidemment. Pour qu'une cellule mère donne deux cellules filles génétiquement identiques. Pour que nous soyons impressionnés.

1.1. Le cycle cellulaire

1.1.1 Les quatre phases du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire des cellules eucaryotes regroupe l'ensemble des phénomènes qui séparent deux divisions successives. Historiquement, on ne distinguait que 2 phases, observables au microscope : la phase de division ou mitose, de courte durée, et la phase d'entre-divisions, appelée interphase, occupant la majeure partie du cycle. La découverte d'une courte période de réplication de l'ADN au cours de l'interphase a abouti à sa subdivision en trois phases : la phase G1 (Gap ou Growth 1), en général la plus longue du cycle, phase de croissance durant laquelle la cellule prépare la duplication de son matériel héréditaire, qui se déroule au cours de la phase S (Synthesis), elle-même suivie par la phase G2 (Gap ou Growth 2), nouvelle phase de croissance qui prépare à la division mitotique (**figure I 1**). Pendant la phase M (Mitosis), les chromosomes sont ségrégés en deux lots identiques dont vont hériter les 2 cellules filles. Chez les organismes multicellulaires, toutes les cellules ne se divisent pas. Elles quittent alors le cycle cellulaire et entrent en phase G0, dite phase de quiescence. Certaines sont capables de réintégrer le cycle cellulaire suite à un stimulus approprié. D'autres le quittent définitivement et entrent dans un état fonctionnel différencié.

Les quatre étapes du cycle cellulaire se déroulent immuablement dans l'ordre G1/S/G2/M, et une phase ne démarre qu'une fois la phase précédente achevée. Ce qui suppose l'existence de mécanismes de contrôle du cycle cellulaire.

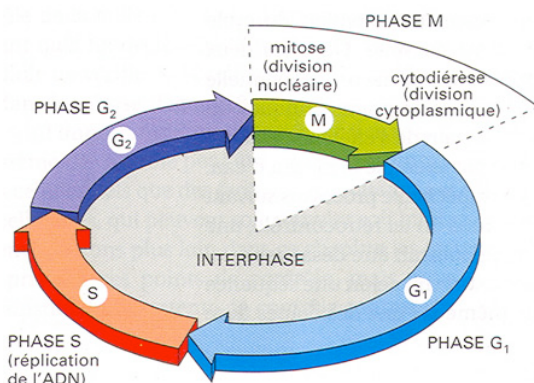


Figure I 1. Le cycle cellulaire des cellules eucaryotes

Les quatre phases du cycle cellulaire : phase G1 (Gap1, croissance), phase S (Synthesis, réplication de l'ADN), phase G2 (Gap2, préparation de la mitose), et phase M (Mitosis, division cellulaire).

1.1.2 Le contrôle du cycle cellulaire

L'isolement de mutants dont la division cellulaire est perturbée a été le point de départ de la compréhension du contrôle du cycle. Les mutants *cdc* (cell division cycle) isolés par Hartwell chez la levure *S. cerevisiae* (Hartwell et al, 1974), associés aux mutants *wee* de la levure fissipare *Schizosaccharomyces pombe* identifiés par Paul Nurse (Nurse, 1975) ont permis la découverte des protéines CDK (Cyclin Dependent Kinase), principaux facteurs de contrôle des passages d'une phase du cycle à la suivante. Comme leur nom l'indique, l'activité des kinases CDK dépend des cyclines. Inconnues lors des travaux d'Hartwell et de Nurse, les cyclines ont été découvertes par Tim Hunt au début des années 80 en tant que protéines dégradées à chaque division cellulaire (Evans et al, 1983). Hunt a alors proposé un modèle de cycle cellulaire contrôlé par la synthèse et la dégradation des cyclines, qui a bien entendu ravi Hartwell et Nurse, farouches défenseurs d'un contrôle du cycle par les CDK. Un événement-clé a permis d'unifier les 2 modèles : la purification par Gautier *et al.* du MPF (Meiosis Promoting Factor), facteur induisant l'entrée en mitose et en méiose identifié par Yoshio Masui (Masui & Markert, 1971), qui ne figure curieusement pas parmi les lauréats du Prix Nobel 2001. Le MPF est en effet constitué de deux sous-unités différentes, une CDK et une cycline (Gautier et al, 1988; Gautier et al, 1990). Les CDK ne sont actives que sous la forme d'un complexe entre une sous-unité catalytique portant l'activité kinase, la CDK elle-même, et une sous-unité régulatrice, la cycline. Ainsi, les variations de la concentration des cyclines au cours du cycle, et leur activation périodique des CDK, constituent l'horloge centrale du cycle cellulaire (**figure I 2**). Plusieurs études ont montré par la suite que chaque phase du cycle ainsi que les passages d'une phase à l'autre sont en fait régulés par des complexes cycline-CDK spécifiques. Les mécanismes de contrôle du cycle cellulaire sont très conservés au cours de l'évolution ; les cyclines, comme les CDK, sont présentes chez tous les eucaryotes (pour une revue sur les cyclines, (Murray, 2004) ; sur les CDK, (Morgan, 1997)).

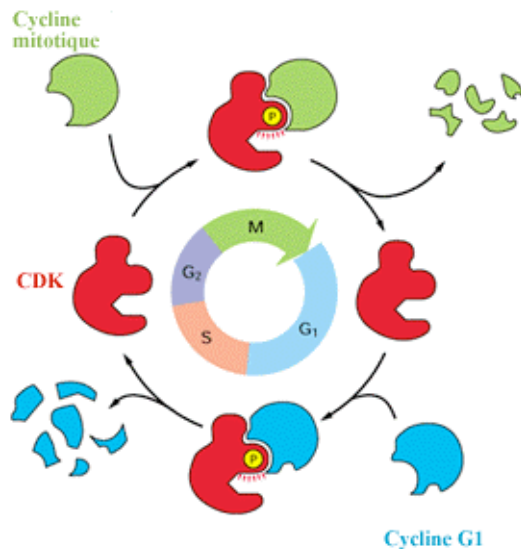


Figure I 2. Vue générale de la régulation du cycle cellulaire par les complexes cyclines-CDK (d'après B. Arcangioli)

Les variations de la concentration des cyclines au cours du cycle et leur activation périodique des CDK constituent l'horloge centrale du cycle cellulaire. On distingue 2 types de cyclines chez la levure *S. cerevisiae*, les cyclines de la phase G1 (Cln) et les cyclines de type B (Clb, cyclines de la phase S et cyclines mitotiques). La quantité des cyclines est régulée au niveau transcriptionnel et post-traductionnel (dégradation par le système ubiquitine-protéasome).

1.2 Les checkpoints

1.2.1 Du checkpoint mitotique...

L'horloge centrale cyclines-CDK tourne rond. S succède à G1, G2 à S, M à G2... et on recommence (à condition, toutefois, que les conditions de croissance soient satisfaisantes). Une vraie horloge suisse ! Un programme autonome, constitutif, qui assure la multiplication des cellules. Mais tout ne va pas toujours pour le mieux dans le meilleur des mondes. Au contraire, la cellule est perpétuellement soumise à des stress, tant exogènes qu'endogènes, qui sont susceptibles de perturber cette belle machinerie. Hartwell avait ainsi remarqué que l'irradiation aux rayons X des levures ou l'ajout d'agents mutagènes provoquent un arrêt du cycle cellulaire (Hartwell et al, 1974). Il semblait donc exister *a priori* un mécanisme de contrôle qui tiendrait la cellule informée du bon déroulement du cycle et qui, en cas de problème, arrêterait l'horloge. Suite aux observations de Hartwell, Ted Weinert a testé les conséquences d'une irradiation aux rayons X sur le cycle cellulaire de différents mutants radiosensibles. Il a alors montré que l'inactivation du gène *RAD9* (Radiation sensitive 9), en particulier, élimine la régulation du cycle par les radiations : les mutants *rad9Δ* continuent un temps de se diviser, donnant naissance à des microcolonies de cellules non-viables du fait des lésions au sein de leur génome (Weinert & Hartwell, 1988). En d'autres termes, Rad9 contrôle l'intégrité de l'ADN et arrête le cycle avant la mitose tant que les dommages ne sont pas réparés. Les checkpoints étaient nés... enfin, pas tout à fait. Reprenons. Le cycle cellulaire renvoie l'image d'une progression unidirectionnelle : la réplication de l'ADN est complétée avant la mitose, la condensation des chromosomes précède leur ségrégation, qui précède elle-même la cytodierèse... chaque nouvelle phase ne pouvant avoir lieu qu'après complétion de la phase précédente. Comprendre cette dépendance, voilà l'objectif de tous ceux qui étudient le cycle. Or, Ted Weinert travaille avec Leland Hartwell, chantre du contrôle du cycle cellulaire. Les relations de dépendance entre les phases du cycle peuvent résulter de deux mécanismes : soit une contrainte physique ou chimique analogue à une voie métabolique où le produit du premier enzyme sert de substrat au second ; soit une voie de régulation externe qui va inhiber le second événement tant que le premier n'est pas achevé ou s'il ne s'est pas déroulé de façon correcte. Le mutant *rad9* va leur apporter la réponse. L'observation qu'un événement du cycle (la mitose) est bloqué par la présence d'ADN endommagé non pas de façon directe mais par un facteur externe (Rad9) montre que les événements du cycle peuvent être liés entre eux par des mécanismes de régulation qui ne sont pas essentiels au déroulement du cycle lui-même (contrairement à l'horloge moléculaire cyclines/CDK). Rad9 est ainsi responsable de la dépendance de la mitose vis à vis de l'intégrité des chromosomes – une fonction que Weinert et Hartwell ont appelé « checkpoint mitotique » (Weinert & Hartwell, 1988; Hartwell & Weinert, 1989). Ils ont alors proposé que d'autres événements clés du cycle cellulaire, liés par les mêmes contraintes de dépendance, soient eux aussi sous le contrôle de checkpoints. L'isolement de mutants dans lesquels un événement plus tardif se déroulerait alors que l'événement antérieur n'a pas été correctement achevé permettrait leur mise à jour (Hartwell & Weinert, 1989). Depuis, plusieurs autres checkpoints ont en effet été identifiés, parmi lesquels le checkpoint du fuseau qui contrôle l'attachement bipolaire des chromosomes au fuseau mitotique (Hoyt et al, 1991; Li & Murray, 1991).

La notion de checkpoint est donc, par essence, double. Née d'une réponse cellulaire (l'arrêt du cycle) à un stress exogène (une irradiation), elle est devenue la fonction qui assure

l'interdépendance des événements du cycle. Cette dualité conceptuelle va longtemps perdurer, et compliquer prodigieusement la perception des checkpoints de l'ADN. On peut remarquer que 9 ans avant Weinert et Hartwell, Painter et Young avaient proposé que la radiosensibilité de cellules issues de patients atteints d'Ataxia-Telangiectasia soit liée à un défaut d'arrêt de l'entrée en mitose plutôt qu'à un défaut de réparation de l'ADN endommagé (Painter & Young, 1980). Leur conclusion : l'arrêt du cycle fait partie de la réponse aux dommages de l'ADN. Une sacrée découverte, déjà...

1.2.2 ...aux mécanismes de surveillance de l'ADN

Déjà ambiguë, la notion de checkpoint a peu à peu gagné en complexité. En 1993, il a ainsi été montré que Rad9 est également impliquée dans le contrôle de l'entrée en phase S de cellules dont l'ADN a été lésé en G1 (Siede et al, 1993). Une protéine, mais 2 points d'arrêt du cycle. L'année suivante, Ted Weinert a identifié quatre nouveaux gènes impliqués dans le checkpoint mitotique – un checkpoint désormais à deux composantes, qui entraîne l'arrêt des cellules soit en phase S, soit en phase G2 (Weinert et al, 1994). Quasi-simultanément, Allen et al. ont montré qu'une même protéine, Rad53, est impliquée dans les arrêts du cycle aux phases G1, S et G2 en réponse aux dommages de l'ADN ou au blocage de la réplication (Allen et al, 1994).

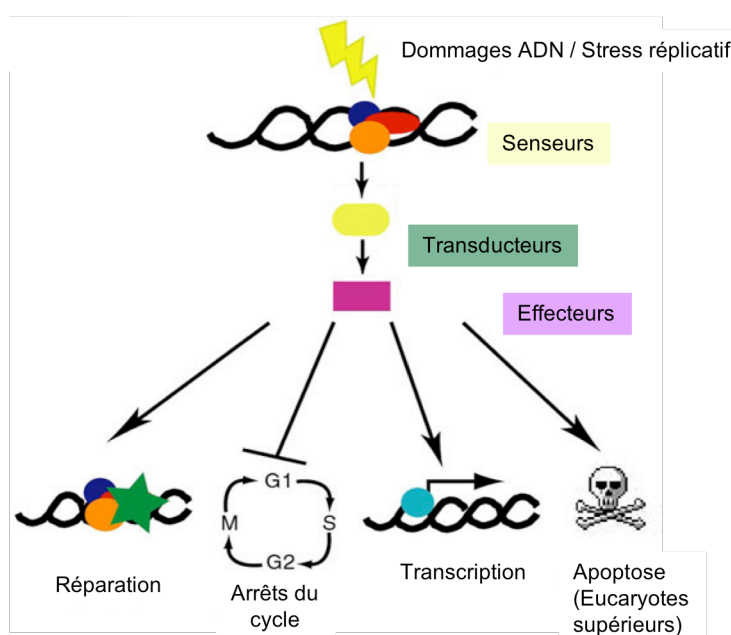


Figure I 3. Les checkpoints de l'ADN. Adapté de (Zhou & Elledge, 2000)

Les mécanismes de surveillance de l'ADN regroupent les voies de transduction (composées de senseurs, de transducteurs et d'effecteurs du signal) qui coordonnent différentes réponses cellulaires (arrêts du cycle cellulaire, activation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle des systèmes de réparation, apoptose) aux dommages de l'ADN ou au blocage de la réplication.

Trois points d'arrêt du cycle, trois checkpoints, mais les mêmes protéines impliquées. On parle alors *des* checkpoints de l'ADN, en lieu et place du checkpoint mitotique originel, en français de mécanismes de surveillance de l'ADN. Ils entraînent le ralentissement du cycle cellulaire en réponse à des dommages de l'ADN ou à un stress réplcatif pour donner à la cellule le temps de réparer les lésions. Un retour aux conclusions de Ted Weinert en 1988, de Painter et Young en 1980 ; un retour aux sources. Mais déjà, un autre rôle se fait jour. Les

protéines du checkpoint ne font pas que bloquer le cycle, elles sont aussi impliquées dans la réponse transcriptionnelle aux dommages de l'ADN (Allen et al, 1994). Une nouvelle crise d'identité (pour une revue sur la vision des checkpoints à cette époque, (Elledge, 1996)). En parallèle, les protéines des checkpoints ont été caractérisées biochimiquement, et une voie de transduction basée sur une cascade de phosphorylations, depuis la détection des dommages par des protéines « senseurs » qui détectent les lésions jusqu'aux effecteurs de la réponse aux dommages de l'ADN, a été dévoilée. Les efforts portés sur la compréhension des voies moléculaires reliant la détection des dommages à l'arrêt du cycle vont eux aussi révéler que, justement, les checkpoints de l'ADN ne se limitent pas à un blocage du cycle. En plus de leur rôle dans la réponse transcriptionnelle aux dommages de l'ADN, ils sont également impliqués dans l'activation des systèmes de réparation et, chez les eucaryotes supérieurs, dans l'induction de l'apoptose. On aboutit ainsi à une vision intégrée des checkpoints au sein de la réponse cellulaire globale aux dommages de l'ADN (**figure I 3**) (Zhou & Elledge, 2000).

1.3 Fin du prélude

Les événements les plus importants du cycle cellulaire sont probablement la réplication du génome et la ségrégation des génomes répliqués dans les 2 cellules filles formées au cours de la division. Contrôler l'interdépendance des différentes phases du cycle cellulaire pour assurer que la réplication de l'ADN et la ségrégation des chromosomes soient correctement exécutées, tel est le rôle des checkpoints définis par Leland Hartwell et Ted Weinert. Le checkpoint du fuseau mitotique, qui coordonne l'assemblage du fuseau et la mitose, répond parfaitement à cette définition (Hoyt et al, 1991; Li & Murray, 1991). La vision actuelle des checkpoints de l'ADN est très différente mais n'est absolument pas contradictoire avec une transmission fidèle des chromosomes, qui repose en fait sur une surveillance constante de l'intégrité du génome.

En conclusion, les mécanismes de surveillance, ou checkpoints, de l'ADN sont des voies de transduction du signal activées suite à des lésions de l'ADN ou au blocage de la réplication. Ils sont actifs tout au long de l'interphase et coordonnent différentes réponses aux dommages de l'ADN comme l'arrêt du cycle cellulaire, l'activation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle des systèmes de réparation, ou encore l'apoptose ; cette réponse globale aux dommages est couramment dénommée DDR, pour DNA Damage Response.

Cette courte introduction présentera les mécanismes de surveillance de l'ADN chez la levure de boulangerie *Saccharomyces cerevisiae*, et se concentrera plus particulièrement sur un acteur clé de ces voies, la protéine kinase Rad53.

2. Organisation générale des checkpoints de l'ADN

La **figure I 4** présente un modèle d'activation des checkpoints chez *S. cerevisiae* selon la phase du cycle et le type de stress (génotoxique ou réplcatif). Même si des différences notables existent, la voie de transduction du signal est similaire et permet de séparer les protéines du checkpoint en 3 catégories : les senseurs, les protéines adaptatrices et les protéines effectrices. Les senseurs reconnaissent différentes structures ou lésions de l'ADN et activent la voie de signalisation ; les adaptateurs transduisent le signal et favorisent l'activation des protéines kinases effectrices, dont les substrats vont assurer la réponse cellulaire aux dommages. Les composants principaux des checkpoints de l'ADN sont remarquablement conservés chez tous les eucaryotes (**tableau I 1**) (Melo & Toczyski, 2002).

Nous détaillerons ci-après les protéines impliquées dans les checkpoints de l'ADN chez *S. cerevisiae*.

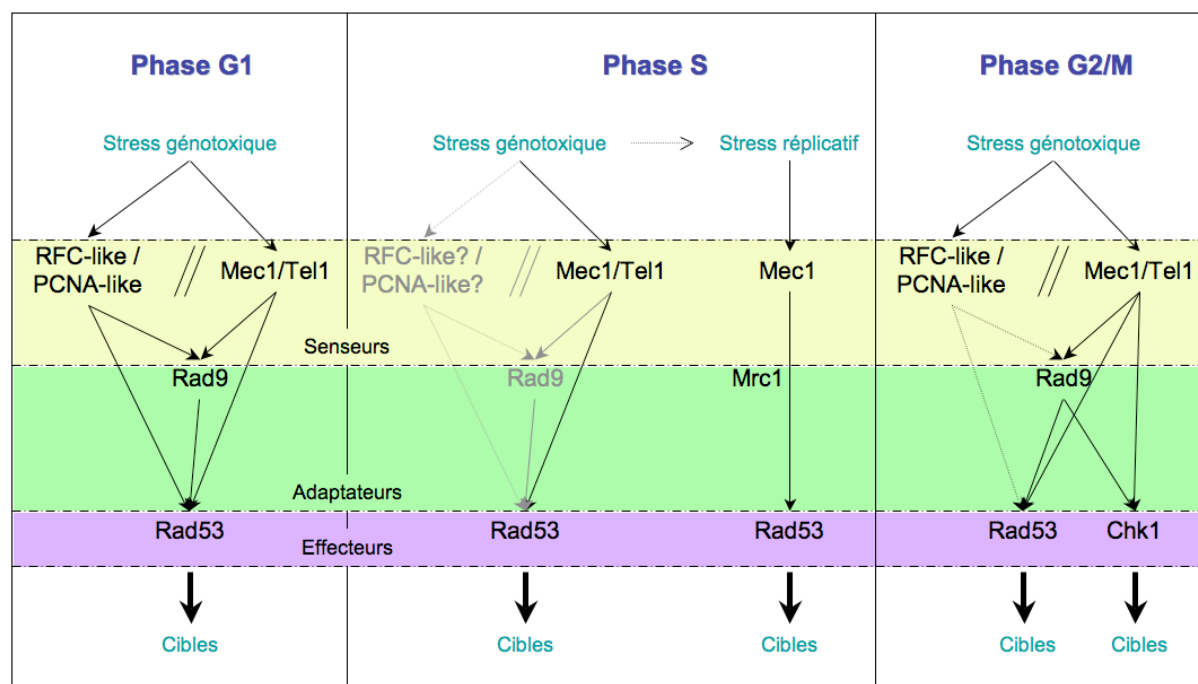


Figure I 4. Modèle d'activation des checkpoints de l'ADN chez *S. cerevisiae* selon la phase du cycle et le type de stress (d'après C. Clémenson)

Ce modèle est construit à partir des données bibliographiques disponibles. Les flèches grises correspondent aux éléments toujours discutés à l'heure actuelle.

2.1 Protéines senseurs

Elles regroupent deux types de protéines : les kinases de type ATM/ATR et les complexes de type RFC et PCNA.

2.1.1 Kinases de type ATM/ATR

Des protéines kinases de très grande taille possédant un domaine C-terminal homologue aux phosphatidylinositol 3-kinases (PI3K) sont impliquées dans toutes les réponses des checkpoints de l'ADN, chez tous les eucaryotes. Chez *S. cerevisiae*, il s'agit des protéines kinases Mec1 et Tel1, homologues respectifs d'ATR et ATM chez les mammifères. Mec1 est la protéine centrale, initiatrice de tous les checkpoints, alors que le rôle de Tel1 semble minime et n'est réellement révélé qu'en absence de Mec1 (Sanchez et al, 1996; Usui et al, 2001; Nakada et al, 2003; Clerici et al, 2004). Au contraire, ATM et ATR jouent toutes deux un rôle majeur dans la DDR (Abraham, 2001).

Mec1 est constitutivement associée à la protéine Ddc2 (ATRIP chez les mammifères), qui semble agir comme la sous-unité régulatrice du complexe et assurer son recrutement au niveau des lésions de l'ADN (Paciotti et al, 2000; Rouse & Jackson, 2000; Zou & Elledge, 2003). Ddc2 est phosphorylée par Mec1 durant les phases S et G2 du cycle cellulaire, ainsi qu'en réponse aux dommages de l'ADN (Paciotti et al, 2000). L'activation de Mec1 déclenche la voie de transduction des checkpoints. Elle entraîne en particulier la phosphorylation rapide des kinases effectrices. D'autres protéines senseurs sont néanmoins nécessaires pour assurer une activation optimale des cibles de Mec1.

Class of check-point protein	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. pombe</i>	<i>Xenopus</i>	Mammalian
Sensors	Rad24	Rad17	Rad17	Rad17
	Ddc1	Rad9	Rad9	Rad9
	Mec3	Hus1	Hus1	Hus1
	Rad17	Rad1	Rad1	Rad1
	Mec1	Rad3	ATR	ATR
	Ddc2	Rad26	???	ATRIP
	Tel1	Tel1	ATM	ATM
Adaptors	Rad9	Crb2	???	BRCA1???
	Mrc1	Mrc1	Claspin	Claspin
Effector kinases	Rad53	Cds1	Cds1	Chk2
	Chk1	Chk1	Chk1	Chk1

Tableau I 1. Les protéines des checkpoints de l'ADN chez les eucaryotes. Extrait de (Melo & Toczyski, 2002)

Correspondance entre gènes homologues. Le nom générique de chaque composant est en gras.

2.1.2 Complexes de type RFC et PCNA

Les complexes de type RFC (RFC-like) et PCNA (PCNA-like, aussi appelé complexe 9-1-1) participent à l'activation des checkpoints à toutes les phases du cycle, et sont recrutés indépendamment de Mec1 au niveau de la lésion (Kondo et al, 2001; Melo et al, 2001). Ces 2 complexes sont les pendants « checkpoints » des complexes de réplication RFC (Replication Factor C, un pentamère composé des sous-unités Rfc1-Rfc5) et PCNA (Prolifering Cell Nuclear Antigen, un homotrimère). Le complexe RFC-like est un complexe RFC dans lequel la sous-unité Rfc1 est remplacée par la protéine de checkpoint Rad24 (Griffiths et al, 1995; Green et al, 2000). La présence des 4 autres sous-unités Rfc « classiques » souligne le rôle direct de certains facteurs de réplication dans l'activation des checkpoints (Navas et al, 1995). Le complexe PCNA-like est formé de 3 protéines, Rad17, Ddc1 et Mec3, qui présentent des similitudes de séquence avec PCNA (Venclovas & Thelen, 2000). De même que le complexe RFC (« clamp loader ») permet le chargement de PCNA (« sliding clamp ») sur l'ADN au cours de la réplication, le système clamp-clamp loader spécifique des checkpoints permet le recrutement du complexe Rad17/Ddc1/Mec3 au niveau de la lésion (Majka & Burgers, 2003). Bien que l'activation Mec1-dépendante de Rad53 en réponse aux dommages soit considérablement amoindrie en absence de Rad24 ou du PCNA-like (de la Torre-Ruiz et al, 1998), leur rôle est encore mal compris. Par analogie au complexe PCNA qui glisse le long de l'ADN et recrute les ADN polymérases δ , α et ϵ , il est fréquemment suggéré que le complexe PCNA-like sert de plateforme de recrutement des substrats de Mec1, en particulier des protéines adaptatrices (Zou et al, 2002). Récemment, un dialogue fonctionnel étroit entre Mec1 et les complexes de type RFC et PCNA a été décrit : Mec1 phosphoryle Rad24 ainsi que les sous-unités Ddc1 et Mec3 du complexe de type PCNA qui, quand il est chargé sur l'ADN, stimule également l'activité kinase de Mec1 (Majka et al, 2006b).

2.1.3 Signal de recrutement des protéines senseurs

Les cassures double-brin de l'ADN (CDB) sont des lésions extrêmement graves pour la cellule ; elles peuvent entraîner une perte majeure d'information génétique (perte d'un fragment chromosomique) ou des anomalies chromosomiques souvent délétaires (translocations...). Chez *S. cerevisiae*, une seule CDB au sein du génome suffit à activer les

checkpoints de l'ADN (Sandell & Zakian, 1993; Lee et al, 1998). Outre les CDB, des lésions très diverses de l'ADN (cassures simple brin, endommagement des bases de l'ADN, pontages intra- ou inter-brins...) entraînent également l'activation des checkpoints. Une question essentielle est donc de déterminer si les protéines senseurs reconnaissent directement ou non les différents types de lésions. Il est aujourd'hui admis qu'une lésion doit en général d'abord être modifiée et que seules certaines structures ADN-protéines interviennent dans le recrutement des protéines de checkpoint. Les protéines des complexes de réparation sont souvent impliquées dans la « maturation » des lésions (on parle de « processing ») en intermédiaires reconnaissables par les protéines de checkpoint. Les nucléofilaments d'ADN simple brin recouvert par RPA (Replication Protein A, un hétérotrimère constitué des sous-unités Rfa1-3 se liant à l'ADN simple brin), générés au cours des différents processus de réparation de l'ADN ou en cas de blocage de la fourche de réplication (Branzei & Foiani, 2005), constituent un très bon candidat pour activer les checkpoints (pour une revue, (Branzei & Foiani, 2006; Harrison & Haber, 2006)). L'inactivation de Rfa1 réduit ainsi fortement le recrutement d'ATRIP/Ddc2 au niveau d'une CDB *in vivo* et au niveau de fragments d'ADN simple brin *in vitro* (Zou & Elledge, 2003). RPA interagit également avec les complexes de type RFC et PCNA, et favorise le chargement du complexe PCNA-like sur l'ADN (Wu et al, 2005; Majka et al, 2006a). Le remodelage de la chromatine semble aussi impliqué dans l'activation des checkpoints, et en particulier d'ATM (Bakkenist & Kastan, 2003) (voir paragraphe 3.6).

La collaboration entre protéines des checkpoints et protéines des systèmes de réparation renforce la vision intégrative actuelle de la DDR. Elle est particulièrement évidente en réponse à des CDB. En effet, suite à l'induction de CDB, on observe la redistribution d'un grand nombre de protéines de checkpoints et de réparation de l'ADN d'une localisation nucléaire diffuse à une localisation en foyers nucléaires (Haaf et al, 1995; Lisby et al, 2001). Ces foyers co-localisent *in vivo* avec les CDB, et correspondent à des centres de réparation de l'ADN par recombinaison homologue, capables de recruter simultanément plusieurs CDB (Lisby et al, 2001). En fusionnant différents acteurs de la réponse aux CDB à des variants de la GFP (Green Fluorescent Protein), Lisby *et al.* ont pu visualiser *in vivo* les relations spatio-temporelles entre les protéines de checkpoint et de réparation de l'ADN – une véritable chorégraphie (Lisby et al, 2004).

2.2 Protéines kinases effectrices

Deux protéines kinases, aux noms génériques de Chk1 et Chk2 (pour Checkpoint kinase) chez les eucaryotes supérieurs, permettent la transduction et l'amplification du signal depuis la détection des lésions par les senseurs jusqu'aux effecteurs de la réponse aux dommages de l'ADN.

La sérine/thréonine kinase Rad53, homologue de Chk2, occupe une place centrale au sein des checkpoints de l'ADN chez *S. cerevisiae*. Une cellule dont le gène *RAD53*¹ a été inactivé présente une hypersensibilité à tous les stress génotoxiques et réplicatifs ; de plus, son niveau de sensibilité est, avec le mutant *mec1Δ*, le plus élevé parmi tous les mutants des checkpoints de l'ADN (Desany et al, 1998). Rad53 est phosphorylée par Mec1 en réponse aux dommages de l'ADN ou à un stress réplicatif ; elle contrôle les différents arrêts du cycle cellulaire (au sein de la phase S et aux transitions G1/S et G2/M) ainsi que l'activation transcriptionnelle et

¹ Chez *S. cerevisiae*, par convention, la forme sauvage d'un gène s'écrit *GENE*, une forme mutante *gene*.

post-transcriptionnelle des systèmes de réparation (Branzei & Foiani, 2006). Rad53 constituant le cœur de notre étude, elle sera décrite plus en détails dans le paragraphe 2.4.

En plus de Rad53, Mec1 active une deuxième kinase effectrice, Chk1. Chk1 est nécessaire, avec Rad53, à l'arrêt du cycle en G2/M (Sanchez et al, 1999). Mais contrairement au mutant *rad53Δ*, l'inactivation de Chk1 n'entraîne qu'une légère sensibilité aux stress génotoxiques. De plus, l'absence de Chk1 n'affecte ni les checkpoints de phase S, ni la réponse transcriptionnelle aux dommages (Sanchez et al, 1999).

Les rôles respectifs de Rad53 et Chk1 sont propres à *S. cerevisiae* et ne reflètent pas nécessairement ceux observés pour leurs homologues chez le Xénope, la levure fissipare *S. pombe* ou les mammifères (Melo & Toczyski, 2002). Il existe ainsi une grande divergence des cibles régulées par les kinases effectrices Chk1 et Chk2 au sein des eucaryotes, probablement liée aux spécificités du cycle cellulaire propres à chaque organisme.

2.3 Adaptateurs

Les adaptateurs se lient aux protéines kinases effectrices et favorisent leur activation par les kinases de type ATM/ATR. On distingue 2 classes d'adaptateurs : les protéines à domaine BRCT (Breast Cancer Carboxyl Terminus) et les claspines.

La fonction des adaptateurs a été révélée grâce à l'étude du rôle de la protéine à domaine BRCT Rad9 dans l'activation de Rad53 chez *S. cerevisiae*. En réponse aux dommages de l'ADN, la protéine Rad9 est phosphorylée de façon Mec1 et Tel1-dépendante (Emili, 1998; Vialard et al, 1998). La phosphorylation de Rad9 entraîne son oligomérisation via son domaine BRCT (Soulier & Lowndes, 1999). Rad53 se lie spécifiquement à la forme phosphorylée de Rad9 grâce à ses 2 domaines FHA (Forkhead-associated, décrits plus en détails ci-dessous) (Sun et al, 1998; Schwartz et al, 2002) spécialisés dans la reconnaissance des phosphopeptides (Durocher et al, 1999). Cette association favorise la phosphorylation de Rad53 par Mec1 (Sun et al, 1996; Sun et al, 1998). De plus, en augmentant localement la concentration de Rad53, Rad9 permet son autophosphorylation en *trans* (une protéine Rad53 phosphoryle une autre protéine Rad53), ce qui conduit à l'activation de Rad53 et à la dissociation du complexe Rad9-Rad53 (Gilbert et al, 2001) (**figure I 5**).

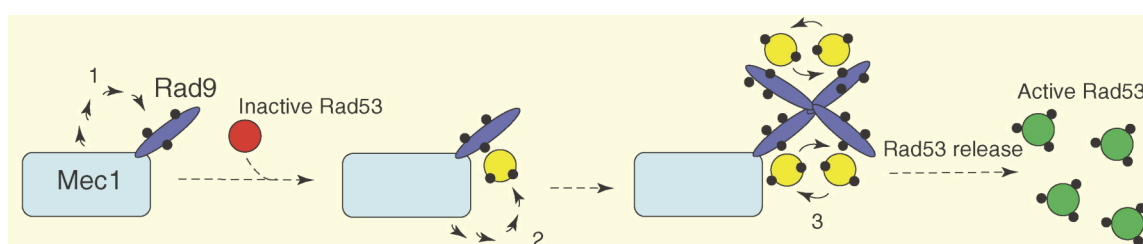


Figure I 5. Modèle d'activation de Rad53. Adapté de (Pellicioli & Foiani, 2005)

Mec1 phosphoryle Rad9 (étape 1). Rad53 se lie spécifiquement à la forme phosphorylée de Rad9 grâce à ses 2 domaines FHA. Cette association favorise la phosphorylation de Rad53 par Mec1 (étape 2). L'oligomérisation de Rad9 augmente localement la concentration de Rad53, ce qui permet son autophosphorylation en *trans* (étape 3). Les formes activées de Rad53 se dissocient alors du complexe Rad9-Rad53.

Rad9 est également nécessaire à la phosphorylation de Chk1 suite aux dommages de l'ADN, probablement par un mécanisme similaire (Sanchez et al, 1999). Par contre, Rad9 n'est pas requise pour l'activation Mec1-dépendante de Rad53 en réponse à un blocage de la réplication (checkpoint réplication). Une protéine adaptatrice de la famille des claspines,

Mrc1 (Mediator of the Replication Checkpoint), joue ce rôle (Alcasabas et al, 2001) (**figure I 4**).

Un modèle de l'activation des checkpoints en réponse au dommages de l'ADN est présenté ci-dessous (**figure I 6**).

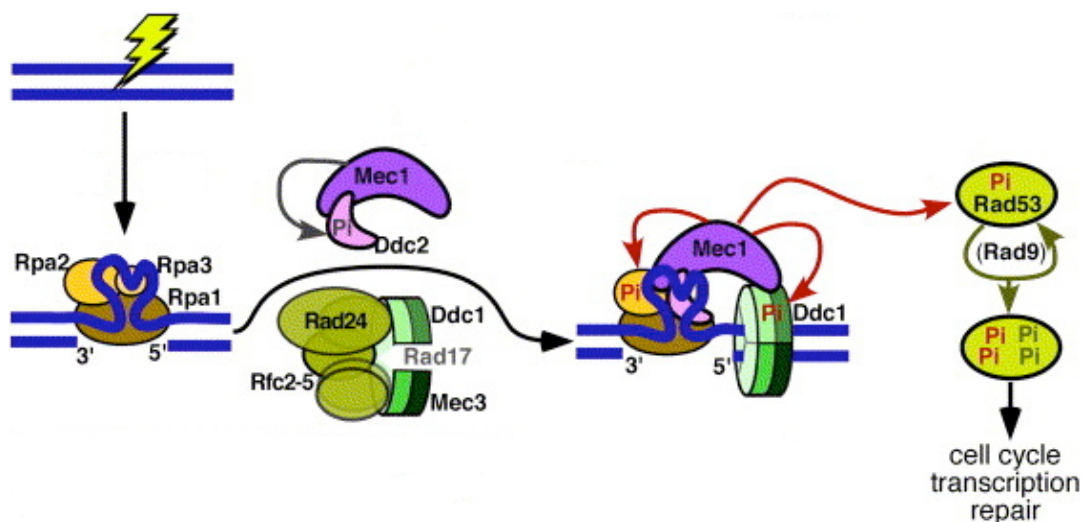


Figure I 6. Modèle d'activation des checkpoints en réponse aux dommages de l'ADN chez *S. cerevisiae*. Adapté de (Majka et al, 2006a)

Les nucléofilaments d'ADN simple brin recouvert par RPA servent de signal activant les protéines de checkpoint. Les complexes Mec1/Ddc2 et Rad17/Ddc1/Mec3 (PCNA-like) sont recrutés indépendamment au site du dommage, à l'aide du complexe Rad24/Rfc2-5 (RFC-like) dans le cas de Rad17/Ddc1/Mec3. S'ensuit la phosphorylation de Ddc2 et du complexe PCNA-like par Mec1. Rad9 est alors recrutée au niveau de la lésion ; sa phosphorylation par Mec1 permet la fixation de Rad53 et son activation.

2.4 La protéine kinase Rad53

Avant de détailler les réponses cellulaires contrôlées par les checkpoints de l'ADN, arrêtons-nous un instant sur la protéine Rad53, cœur de notre étude.

2.4.1 Identification

Rad53 a été originellement identifiée en 1991 dans un crible biochimique en tant que sérine/thréonine kinase (Stern et al, 1991). Mais ce n'est qu'à partir de 1994 et sa co-(re)découverte par Weinert (sous le nom de Mec2) (Weinert et al, 1994) et Allen (sous le nom de Sad1) (Allen et al, 1994) en tant que composant majeur des checkpoints de l'ADN que gloire et célébrité furent au rendez-vous. *RAD53* est le membre fondateur de la famille des « checkpoint kinases 2 » (homologues du gène humain CHK2).

RAD53 est un gène essentiel (une souche *rad53Δ* n'est pas capable de pousser dans les conditions standards de croissance). Cette létalité est abolie par la surexpression de *RNR1* ou *RNR3*, 2 gènes codant la grande sous-unité de la RNR (Ribonucléotide Reductase) qui catalyse l'étape limitante de la biosynthèse des dNTP (Desany et al, 1998). L'inactivation de Sml1, un inhibiteur stoéchiométrique de la RNR, sauve également une souche *rad53Δ* d'une mort certaine (Zhao et al, 1998). Cependant, l'augmentation intracellulaire en dNTP engendrée par la surexpression de *RNR1* ou *RNR3* ou la délétion de *SML1* ne sauve pas les fonctions « checkpoints » de Rad53 : la souche est viable mais demeure hypersensible aux stress génotoxiques (Desany et al, 1998).

2.4.2 Description

Le gène *RAD53* (Radiation sensitive 53, *alias MEC2, SAD1, LSD1, SPK1*), situé sur le chromosome XVI, code une protéine de 821 résidus, dont la masse moléculaire est de 91,6kDa. Cette protéine comporte plusieurs domaines remarquables (**figure I 7**) :

- (i) Un domaine central sérine/thréonine kinase porteur de l'activité catalytique.
- (ii) Un domaine bipartite de localisation nucléaire (Zheng et al, 1993).
- (iii) Deux clusters SQ/TQ correspondant à des séquences riches en sérines et thréonines, sites préférentiels de phosphorylation par les kinases Mec1/Tel1 (Lee et al, 2003b).
- (iv) 2 domaines FHA situés de part et d'autre du domaine kinase. Les domaines FHA sont des modules d'interaction protéine-protéine phospho-spécifiques (Durocher et al, 1999). Ils sont présents dans un grand nombre de protéines, en particulier les protéines des checkpoints, et jouent un rôle important dans les voies de signalisation (Durocher & Jackson, 2002).

En plus du domaine FHA1 aminoterminal conservé dans toutes les protéines de la famille Chk2, Rad53 possède un domaine FHA2 supplémentaire C-terminal. Des mutations combinées des 2 domaines FHA de Rad53 confèrent une hypersensibilité aux stress génotoxiques proche de celle d'un mutant *rad53Δ* (Schwartz et al, 2003). FHA2 est nécessaire à l'interaction de Rad53 avec la forme hyperphosphorylée de Rad9 et à l'activation subséquente de Rad53 (Sun et al, 1998; Gilbert et al, 2001; Schwartz et al, 2002). Même s'il peut se lier à Rad9 phosphorylée *in vitro* (Durocher et al, 1999), le domaine FHA1 pourrait aussi intervenir dans les interactions de la protéine Rad53 activée avec ses cibles dans le checkpoint de la réplication (Pike et al, 2004). Des mutations affectant le domaine FHA de Chk2 sont à l'origine de certains cas du syndrome de Li-Fraumeni caractérisé par l'apparition de multiples tumeurs primaires (Bell et al, 1999).

2.4.3 Sites de phosphorylation de Rad53

Deux études ont identifié les sites de phosphorylation de Rad53 en réponse au MMS (Méthyl Méthanesulfonate) (Smolka et al, 2005) et au 4NQO (4-Nitroquinoline 1-Oxide) (Sweeney et al, 2005), 2 agents alkylants endommageant l'ADN (Friedberg et al, 2005) (**figure I 7**). Plus de 20 résidus sérine ou thréonine sont phosphorylés, soit par autophosphorylation de Rad53, soit par des phosphorylations en *trans* (Sweeney et al, 2005). Comme attendu, la majorité des phosphorylations en *trans* affecte des résidus des clusters SQ/TQ, séquence consensus des kinases de la famille ATM/ATR (Lee et al, 2003b).

Une stratégie de phosphorylations multiples pourrait permettre d'éviter une activation futile de Rad53 si le signal est trop faible. Les sites de phosphorylation détectés dans les 2 études ne sont de plus que très partiellement redondants. Le cluster SQ/TQ N-terminal semble par exemple phosphorylé spécifiquement suite à un traitement au MMS (Sweeney et al, 2005). Bien que l'on ne puisse exclure l'incidence des méthodologies utilisées pour identifier les sites de phosphorylation, ces résultats suggèrent que la nature des lésions peut directement influencer l'action de Rad53 en créant notamment des « phospho-interfaces » spécifiques à l'origine d'interactions sélectives (Pelliccioli & Foiani, 2005).

En conclusion, la multiplicité et la spécificité des sites de phosphorylation révèlent une régulation de Rad53 qui semble bien plus fine et complexe que le passage d'une forme inactive à une forme activée.

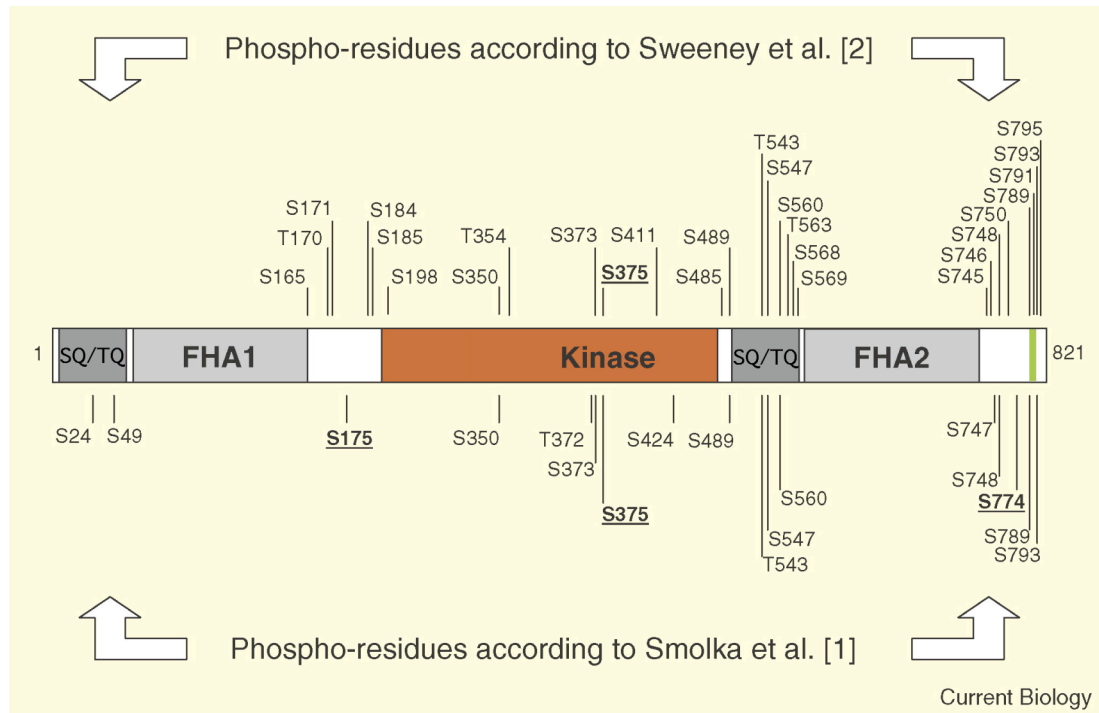


Figure I 7. La protéine kinase Rad53 et ses sites de phosphorylation. Adapté de (Pellicioli & Foiani, 2005)

Les principaux domaines de Rad53 ainsi que les résidus phosphorylés en réponse au MMS (Smolka et al, 2005) ou au 4NQO (Sweeney et al, 2005) sont indiqués. Le segment vert représente le signal bipartite de localisation nucléaire.

3. Mécanismes d'action des checkpoints de l'ADN

Les checkpoints de l'ADN coordonnent de multiples réponses cellulaires aux dommages de l'ADN ou à un blocage de la réplication. On distingue plusieurs types de réponses : le ralentissement ou l'arrêt du cycle cellulaire, la stabilisation des fourches de réplication, l'activation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle des systèmes de réparation, la régulation de la RNR ou encore le remodelage de la chromatine. N'oublions pas non plus d'inactiver les checkpoints de l'ADN, afin que tout rentre dans l'ordre.

3.1 Arrêts du cycle cellulaire

Les arrêts du cycle en réponse à un stress génotoxique ont donné naissance au concept de checkpoints (Weinert & Hartwell, 1988; Hartwell & Weinert, 1989). A tout seigneur tout honneur, c'est donc par eux que nous commencerons.

3.1.1 Arrêt à la transition G1/S

L'exposition des cellules de *S. cerevisiae* au phéromone de conjugaison alpha (plus communément appelé facteur α) entraîne un arrêt du cycle en phase « équivalent G1 ». Siede *et al.* ont montré que des cellules préalablement synchronisées au facteur α puis exposées aux rayons γ ou aux UV restent temporairement bloquées en phase G1 de façon *RAD9*-dépendante (Siede *et al.*, 1993). Par la suite, plusieurs travaux ont précisé les bases moléculaires du checkpoint de la phase G1. La transition G1/S est contrôlée par l'accumulation des cyclines de la phase G1, Cln1 et Cln2, qui est régulée principalement au niveau transcriptionnel par le complexe activateur Swi4/Swi6 (pour une revue, (Cross, 1995)). Sidorova et Breeden ont montré qu'en réponse au MMS, Swi6 est phosphorylée de manière Rad53-dépendante en G1

(Sidorova & Breeden, 1997). Cette phosphorylation inactive le complexe Swi4/Swi6, maintenant les transcrits *CLN1/2* à un niveau trop faible pour déclencher le passage en phase S. La protéine Rad53 immunoprécipitée à partir de cellules exposées au MMS est de plus capable de phosphoryler Swi6 *in vitro*, ce qui suggère que Swi6 est un substrat direct de Rad53 (Sidorova & Breeden, 1997).

Beaucoup plus récemment, un deuxième mécanisme à l'origine de l'arrêt en G1 suite à des dommages de l'ADN a été découvert. En réponse au MMS, une voie de signalisation Mec1 et Rad53-dépendante empêche l'exportation nucléaire des ARNt contenant des introns *via* la relocalisation au cytoplasme du principal facteur d'exportation nucléaire des ARNt, la karyophérine Los1. Il semble alors que l'accumulation intra-nucléaire des ARNt non-épissés retarde l'accumulation de Cln2 et donc la transition G1/S (Ghavidel et al, 2007).

L'arrêt en G1 rend compte de la diversité des réponses cellulaires contrôlées par les checkpoints de l'ADN – phosphorylation inhibitrice d'un facteur de transcription, relocalisation d'une protéine – et éclaire la complexité des mécanismes d'amplification du signal suite à leur activation.

3.1.2 Arrêt à la transition G2/M

3.1.2.1 L'arrêt décisif ?

L'arrêt G2/M est l'héritier du checkpoint mitotique défini par Weinert et Hartwell en 1989 (Hartwell & Weinert, 1989). Et malgré la découverte des arrêts à d'autres phases du cycle cellulaire, il est toujours considéré comme l'arrêt principal chez *S. cerevisiae* (Harrison & Haber, 2006).

Weinert et Hartwell ont montré que le maintien artificiel de l'arrêt en G2 obtenu en traitant les cellules avec un inhibiteur de la polymérisation des microtubules permet de sauver la sensibilité du mutant *rad9* aux rayons X, indiquant que leur radiosensibilité est bien liée au défaut d'arrêt du cycle en G2 (Weinert & Hartwell, 1988). Cependant, un même blocage artificiel en G2 n'augmente pas la survie du mutant *rad9* après une exposition aux UV (Aboussekhra et al, 1996). La prévalence de l'arrêt G2/M semble donc dépendre du type de dommages. Les cassures double-brin de l'ADN (le type de lésions induites par les rayons X) sont très majoritairement réparées par recombinaison homologue chez *S. cerevisiae*. La recombinaison homologue utilise l'information génétique d'une molécule d'ADN identique pour réparer la lésion, ce qui rend la présence de deux chromatides sœurs indispensable ; ce système de réparation ne peut donc fonctionner qu'à partir de la phase S dans des cellules de levure haploïdes (pour une revue, (Paques & Haber, 1999)). Les lésions induites par les UV sont quant à elles majoritairement prises en charge par le NER (Nucleotide Excision Repair), un système de réparation actif dès la phase G1 (pour une revue, (Costa et al, 2003)). L'arrêt G2/M apparaît alors essentiel pour la réponse aux cassures double-brin de l'ADN, mais l'arrêt G1/S est important pour la prise en charge d'autres types de lésions. Le rôle « moderne » des checkpoints de l'ADN comme coordinateurs de la réponse aux dommages de l'ADN avec la phase du cycle cellulaire est ici particulièrement mis en lumière (pour une revue très complète sur la régulation de la réparation de l'ADN au cours du cycle cellulaire, (Branzei & Foiani, 2008)).

3.1.2.2 Mécanisme de l'arrêt G2/M

L'entrée en mitose de la levure *S. cerevisiae* est contrôlée par APC/C (Anaphase Promoting Complex/Cyclosome), qui ubiquitinye la sécurine Pds1, un inhibiteur de l'anaphase, et entraîne sa dégradation par le protéasome 26S (Cohen-Fix et al, 1996). L'arrêt en G2/M fait intervenir les 2 protéines kinases effectrices chez *S. cerevisiae*, Rad53 et Chk1 (Sanchez et al, 1999). En réponse aux dommages, Pds1 est hyperphosphorylée de façon Chk1-dépendante, mais Rad53-indépendante (Cohen-Fix & Koshland, 1997). Cette phosphorylation stabilise Pds1 en bloquant son ubiquitinylation par APC/C (Sanchez et al, 1999). Rad53 contribue également à stabiliser Pds1, mais cette fois en inhibant son interaction avec Cdc20, la sous-unité activatrice d'APC/C, même si le mécanisme précis n'est pas connu (Agarwal et al, 2003).

En plus de la régulation de Pds1 et de l'entrée en mitose, Rad53, mais pas Chk1, inhibe la sortie de la mitose en favorisant le maintien de l'activité du complexe Cdc28-cycline B.² Sanchez *et al.* ont proposé un mécanisme dans lequel la polo-like kinase Cdc5, nécessaire pour l'inactivation de Cdc28-Clb lors de la sortie de mitose (Hu et al, 2001b), est phosphorylée et inhibée de façon Rad53-dépendante (Sanchez et al, 1999). Ce modèle a été précisé et en partie invalidé peu après. Cdc5 inhibe le complexe inhibiteur de la sortie de mitose Bub2/Bfa1 par phosphorylation de la sous-unité Bfa1 (Fraschini et al, 1999). Mais contrairement au mécanisme proposé par Sanchez *et al.*, l'hyperphosphorylation de Bfa1 par Cdc5 n'est pas diminuée en réponse aux dommages de l'ADN (Hu et al, 2001b). De plus, Hu *et al.* ont observé une nouvelle modification post-traductionnelle de Bfa1, probablement une phosphorylation, qui dépend de Rad53, suggérant que le complexe Bub2/Bfa1, plutôt que Cdc5, est la cible de Rad53 dans le contrôle de la sortie de mitose (Hu et al, 2001b) (**figure I 8**).

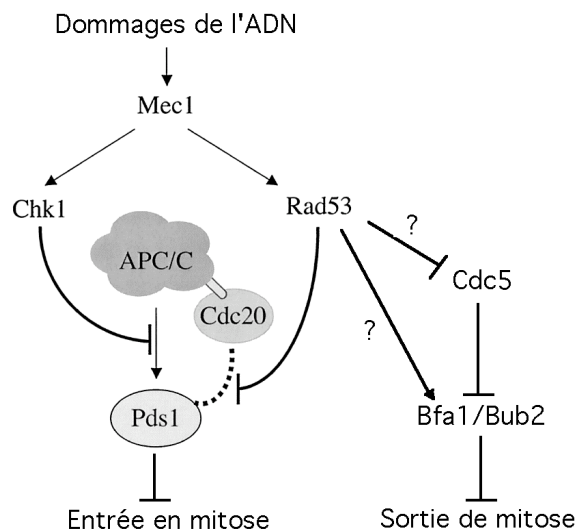


Figure I 8. Vue schématique de l'arrêt G2/M chez *S. cerevisiae*. Adapté de (Agarwal et al, 2003)

En réponse aux dommages, Chk1 inhibe l'ubiquitinylation de Pds1 par APC/C en phosphorylant directement Pds1. Rad53 contribue à stabiliser Pds1 en inhibant son interaction avec Cdc20. Rad53 inhibe également la sortie de mitose, *via* la phosphorylation de Cdc5 ou Bfa1/Bub2.

Précisons enfin que la régulation de l'arrêt en G2/M par les checkpoints de l'ADN chez *S. cerevisiae* est très différente de celle observée chez les eucaryotes supérieurs (métazoaires) ou la levure *S. pombe*, où l'entrée en mitose est inhibée *via* l'inactivation de la CDK1 (homologue de Cdc28) (pour une revue, (Nyberg et al, 2002)).

² Les cyclines de type B (Clb) régulent les phases S et M chez *S. cerevisiae*.

3.2 Checkpoints de la phase S

Contrairement aux arrêts en G1/S et G2/M, le ralentissement de la phase S ne résulte pas d'une régulation de la machinerie de contrôle du cycle cellulaire. Ce n'est de plus pas le seul mécanisme mis en jeu.

3.2.1 Checkpoint intra-S et checkpoint réplication

La progression de la fourche de réplication est ralentie à plusieurs endroits du génome, notamment au niveau des gènes d'ARNt (Deshpande & Newlon, 1996) et des séquences répétées inversées (Lemoine et al, 2005). Ces « sites fragiles » sont souvent associés à des cassures et des réarrangements chromosomiques (Cha & Kleckner, 2002). Des dommages de l'ADN lors de la phase S peuvent aussi provoquer un ralentissement ou un arrêt de la fourche. En réponse est activé le checkpoint de la phase S, couramment subdivisé en checkpoint de la réplication et en checkpoint intra-S, selon que le signal premier correspond à un blocage de la réplication ou à des dommages survenus au cours de la réplication. La différence est tenue, et repose essentiellement sur le type de drogue utilisé pour déclencher le checkpoint. Un traitement à l'hydroxyurée qui, en inhibant la RNR, entraîne une déplétion des pools de dNTP et un ralentissement des fourches (Friedberg et al, 2005) est considéré comme un stress réplicatif. L'exposition de cellules en phase S à un stress génotoxique tel que le MMS provoque des lésions de l'ADN en cours de réplication et *subséquentement* un blocage des fourches. Dans le premier cas, Mrc1 est le principal médiateur de l'activation de Rad53 par Mec1 (Alcasabas et al, 2001) ; Rad24 et le complexe PCNA-like (Rad17/Ddc2/Mec3) plus, dans une moindre mesure, Rad9, sont eux nécessaires en cas de dommages intra-S (Pasero et al, 2003) (**figure I 4**).

3.2.2 Suppression du démarrage des origines tardives de réplication

Un rôle important des checkpoints de la phase S est la suppression Mec1 et Rad53-dépendante du démarrage des origines tardives de réplication. En réponse à l'hydroxyurée, Dbf4, la sous-unité régulatrice du complexe Dbf4-Cdc7 qui contrôle le déclenchement des origines de réplication (Bell & Dutta, 2002), est phosphorylée de manière Rad53-dépendante (Santocanale & Diffley, 1998). Cette phosphorylation provoque le relargage de Dbf4 de la chromatine (Pasero et al, 1999) et réduit l'activité kinase du complexe Dbf4/Cdc7 (Weinreich & Stillman, 1999), ce qui empêche *in fine* le déclenchement des origines tardives de réplication. Enfin, une interaction physique entre Dbf4 et Rad53 a été détectée à la fois par des expériences de double-hybride et de co-immunoprécipitation (Dohrmann et al, 1999; Duncker et al, 2002), et cette interaction est nécessaire pour résister à l'hydroxyurée (Varrin et al, 2005) ; ces résultats suggèrent que Dbf4/Cdc7 est une cible directe du checkpoint de la phase S.

La vitesse de progression de la phase S suite à des dommages est supérieure chez des mutants *rad53* et *mec1* (Paulovich & Hartwell, 1995) (Tercero & Diffley, 2001). La suppression des origines tardives de réplication, en ralentissant mécaniquement la phase S, « donne du temps » à la cellule pour effectuer les réparations nécessaires. A nouveau, un blocage ou un ralentissement du cycle comme mode d'action privilégié des checkpoints.

D'autres travaux ont révélé un deuxième rôle de la voie Mec1-Rad53 dans les checkpoints de la phase S, qui est de stabiliser les fourches de réplication bloquées (Lopes et al, 2001; Tercero & Diffley, 2001). Le maintien de l'intégrité des fourches semble même être la

fonction majeure du checkpoint de phase S, celle qui donne à la cellule une réelle chance de survie (Tercero et al, 2003).

3.2.3 Maintien de l'intégrité des fourches

Des analyses de microscopie électronique ont révélé chez un mutant *rad53* un effondrement rapide des fourches de réplication bloquées et l'accumulation de molécules d'ADN hémirépliquées exposant de larges fragments simple brin, ainsi que des structures ressemblant aux jonctions de Holliday (Sogo et al, 2002). Ces intermédiaires sont des substrats de choix pour les enzymes de recombinaison et donc la source potentielle d'une grande instabilité génomique. La stabilisation par les protéines de checkpoint des fourches bloquées résulte à la fois de la stabilisation de la machinerie protéique de réplication (le réplisome) avec la fourche (Cobb et al, 2003; Lucca et al, 2004) et de l'inhibition des activités de recombinaison au niveau des fourches bloquées (Kai et al, 2005). La phosphorylation de RPA (Brush et al, 1996) et de la polymérase α /primase (Pellicoli et al, 1999), régulée par Mec1/Rad53, stabilise l'association réplisome-fourche. Chez la levure fissipare, l'induction par l'hydroxyurée de la phosphorylation Cds1/Rad53-dépendante de l'endonucléase Mus81 favorise la dissociation de Mus81 de la chromatine et limite ainsi la recombinaison au niveau des fourches bloquées (Kai et al, 2005).

Outre stabiliser les fourches de réplication bloquées, les checkpoints semblent également réguler la reprise de la réplication des fourches qui se sont effondrées (Lopes et al, 2006; Trenz et al, 2006). Le complexe PCNA-like (Rad17/Mec3/Ddc2) favorise par exemple le mécanisme de synthèse translésionnelle (TLS, Translesion Synthesis) (Sabbioneda et al, 2005) qui est, avec la recombinaison, un des principaux moyens permettant le redémarrage d'une fourche effondrée et la reprise de la réplication (Branzei & Foiani, 2005).

En plus des rôles déjà décrits, Krishnan *et al.* ont récemment montré que Mec1 et Rad53 inhibent la ségrégation des chromosomes dont les fourches de réplication sont bloquées en régulant directement la dynamique du fuseau mitotique par la modulation de l'activité des protéines Cin8 et Stu2 associées aux microtubules (Krishnan et al, 2004).

3.3 Apoptose

Les checkpoints de l'ADN régulent également l'apoptose, ou mort cellulaire programmée, chez les eucaryotes supérieurs. L'existence d'un tel mécanisme chez la levure étant plus que controversée, nous nous contenterons d'indiquer une revue qui présente l'état des connaissances dans ce domaine (Burhans et al, 2003).

3.4 Activation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle des systèmes de réparation

Donner du temps à la cellule pour réparer est une fonction majeure des checkpoints de l'ADN, leur « raison d'être » selon James Haber (Harrison & Haber, 2006). Mais comme nous l'avons vu dans le préambule, d'autres rôles des checkpoints sont peu à peu apparus, leur conférant le titre envié de coordinateurs de la réponse aux dommages de l'ADN. La régulation directe des systèmes de réparation, aux niveaux transcriptionnel et post-transcriptionnel, n'y est pas étrangère.

3.4.1 Activation transcriptionnelle des systèmes de réparation

« En plus de l'activation des checkpoints, les dommages de l'ADN entraînent l'induction transcriptionnelle rapide de plusieurs gènes des systèmes de réparation de l'ADN (Friedberg et al., 1995). Ils comprennent en particulier des gènes du NER (*RAD2*, *RAD7*, *RAD16* et *RAD23*), du BER (Base Excision Repair) (*MAG*), du PRR (Post-Replication Repair, autre nom de la TLS) (*RAD6* et *RAD18*) et de la recombinaison homologue (*RAD52* et *RAD54*). Ce groupe comprend également les gènes *RNR1/2/3* des sous-unités de la ribonucléotide réductase. » Ce court extrait d'Aboussekhra *et al.*, par ailleurs très informatif, reflète la vision de la réponse aux dommages de l'ADN qui prévalait en 1995, à savoir l'action autonome de différentes voies de régulation (réparation, arrêts du cycle, transcription...). En montrant que les protéines de checkpoint contrôlent, en cas de stress génotoxique, l'augmentation de certains transcrits favorisant la réparation, cet article a mis pour la première fois en lumière l'existence d'un réseau coordonnant différentes réponses cellulaires aux dommages, et fait évolué la notion de checkpoint (Aboussekhra et al, 1996).

Des études plus récentes ont permis d'analyser la réponse transcriptionnelle aux dommages de l'ADN à l'échelle du génome. Elles ont révélé qu'une fraction importante du transcriptome de *S. cerevisiae* est modifiée suite à un traitement au MMS – environ 400 ORF (Open ReadinG Frame, cadre ouvert de lecture en français), contre une vingtaine connue en 1995 (Jelinsky & Samson, 1999). De plus, une part non négligeable de ces transcrits sont réprimés en présence de stress. Parmi les quelques 325 ORF dont la transcription est augmentée figurent plusieurs gènes des systèmes de réparation, mais également, et en majorité, de très nombreux facteurs dont le rôle dans la réponse aux dommages est plus difficile à appréhender, et dont l'induction n'est de plus pas spécifique aux dommages de l'ADN (Gasch et al, 2000). Une étude similaire réalisée en parallèle dans une souche sauvage et des mutants des checkpoints a permis d'identifier la « signature transcriptionnelle » de Mec1 en réponse aux dommages de l'ADN induits par le MMS et des radiations ionisantes. Mec1 semble au final réguler l'expression d'un nombre assez restreint de gènes, parmi lesquels *RAD51* et *RAD54* de la recombinaison homologue, le gène de checkpoint *DUN1*³ et les gènes *RNR2* et *RNR4* codant des sous-unités de la RNR (Gasch et al, 2001). L'induction par les checkpoints d'une augmentation des transcrits de la RNR suite aux dommages de l'ADN est en fait la réponse transcriptionnelle la mieux caractérisée ; nous la détaillerons dans le paragraphe 3.6. Pour le reste, plusieurs travaux invitent à la prudence. Par exemple, une seule cassure double-brin non réparée provoque chez *S. cerevisiae* l'induction ou la répression de plus de 150 gènes, mais aucun ne semble important pour la réparation de la cassure (Lee et al, 2000). Deux études indépendantes ont montré plus généralement qu'il n'existe pas de corrélation significative entre l'augmentation de la quantité de transcrits d'un gène donné suite à un stress spécifique et un rôle du gène dans la survie des cellules à ce stress (Birrell et al, 2002; Chang et al, 2002).

3.4.2 Régulation post-transcriptionnelle des systèmes de réparation

De nombreux exemples ont montré que la phosphorylation par les checkpoints de protéines impliquées dans la réparation de l'ADN affecte leur fonction (pour une revue, (Branzei & Foiani, 2008)). Chez *S. cerevisiae*, la phosphorylation Rad53-dépendante de la protéine de

³ Dun1 est une protéine kinase à domaine FHA homologue de Rad53 chez *S. cerevisiae*. Dun1 intervient dans les mêmes voies que Rad53 pour l'arrêt en G2/M (Pati et al, 1997; Gardner et al, 1999) et pour l'activation transcriptionnelle de certains gènes dont les gènes RNR (voir paragraphe 3.5.1).

recombinaison Rad55 est nécessaire pour réparer efficacement les dommages survenus au cours de la réplication, probablement en activant la recombinaison (Herzberg et al, 2006). La phosphorylation par Mec1 de la sous-unité Rfa2 du complexe RPA de liaison à l'ADN simple brin pourrait également participer aux processus de réparation (Brush et al, 1996). Mec1 contrôle aussi par phosphorylation l'activité de l'endonucléase Slx4 (Flott et al, 2007) et l'association du complexe ADN polymérase ζ -Rev1 avec une cassure double-brin de l'ADN (Hirano & Sugimoto, 2006), 2 mécanismes qui semblent favoriser la réparation de la cassure. Enfin, Lydall et Weinert ont suggéré que les protéines de checkpoint régulent directement l'activité des exonucléases impliquées dans la « maturation » de la lésion, étape indispensable à sa réparation (Lydall & Weinert, 1995; Jia et al, 2004).

3.5 Régulation de la ribonucléotide réductase

La RNR catalyse la réduction des NDP (nucléoside diphosphate) en dNDP (désoxyribonucéoside diphosphate), étape limitante de la biosynthèse des dNTP, et joue ainsi un rôle crucial dans la synthèse de l'ADN. Son activité est finement régulée afin de maintenir des niveaux suffisants et équilibrés des différents dNTP, et assurer la fidélité de la réplication et de la réparation de l'ADN (pour une revue, (Elledge et al, 1993)).

3.5.1 Mécanismes de régulation

Les checkpoints de l'ADN contrôlent 3 mécanismes qui concourent à l'augmentation de l'activité de la RNR en réponse aux dommages de l'ADN ou à un stress réplcatif (**figure I 9**). Tout d'abord, l'induction transcriptionnelle des gènes *RNR2/3/4* codant des sous-unités de la RNR sous le contrôle de la protéine kinase Dun1 (Zhou & Elledge, 1993). Dun1 est activée par phosphorylation Mec1 et Rad53-dépendante (Zhou & Elledge, 1993; Chen et al, 2007), ce qui entraîne la phosphorylation du répresseur transcriptionnel Crt1 et son relargage des promoteurs des gènes *RNR2/3/4* (Huang et al, 1998). La régulation transcriptionnelle de la RNR en réponse aux dommages est une stratégie conservée au cours de l'évolution. Ainsi, l'expression de la sous-unité p53R2 de la RNR chez les mammifères est induite par p53, le « gardien du génome », en réponse aux dommages de l'ADN (Tanaka et al, 2000).

La voie Mec1/Rad53/Dun1 régule également la RNR au niveau post-transcriptionnel, en induisant, d'une part, la relocalisation de Rnr2 et Rnr4 dans le cytoplasme où se trouvent majoritairement les autres sous-unités de la RNR, Rnr1 et Rnr3, permettant la formation de complexes actifs (Yao et al, 2003), d'autre part en phosphorylant l'inhibiteur de la RNR Sml1, ce qui entraîne sa dégradation (Zhao et al, 1998; Zhao et al, 2001; Zhao & Rothstein, 2002).

Mec1 et Rad53 participent au maintien de l'activité RNR même en absence de stress génotoxique, une fonction essentielle à la viabilité cellulaire. La létalité des mutants *mec1Δ* et *rad53Δ* peut être supprimée, comme nous l'avons vu, par la surexpression de la RNR (Desany et al, 1998), mais également par l'inactivation du gène *SML1* (Zhao et al, 1998).

3.5.2 Concentration en dNTP et résistance aux dommages

L'existence de multiples mécanismes de régulation de la RNR par les checkpoints en cas de dommages de l'ADN souligne l'importance des niveaux de dNTP pour la réparation de l'ADN et la survie cellulaire.

Chez la levure *S. cerevisiae*, la concentration en dNTP augmente de 6 à 8 fois en réponse à des dommages de l'ADN (Chabes et al, 2003). Cette augmentation est directement corrélée à la survie des cellules. Ainsi, des mutants hypomorphes des gènes *RNR* sont hypersensibles aux dommages de l'ADN (Elledge et al, 1992). Au contraire, l'inactivation de Sml1 ou une mutation du site catalytique de la RNR qui augmente artificiellement son activité entraîne une hyper-résistance au stress génotoxique (Zhao et al, 1998; Chabes et al, 2003). Nous avons également constaté au laboratoire que l'inactivation de Crt1 conduit à un phénotype similaire (données non publiées). Chabes *et al.* ont montré que la meilleure survie cellulaire liée à l'augmentation des niveaux de dNTP s'accompagne d'un taux plus élevé de mutations, et ont proposé qu'une concentration accrue en dNTP pourrait augmenter l'efficacité des polymérases δ et ϵ qui resynthétisent les fragments d'ADN excisés par le NER, mais aussi l'action des polymérases translésionnelles qui permettent à la fourche de réplication de progresser malgré une lésion, favorisant la survie de la cellule au détriment de la fidélité de la réparation (Chabes et al, 2003).

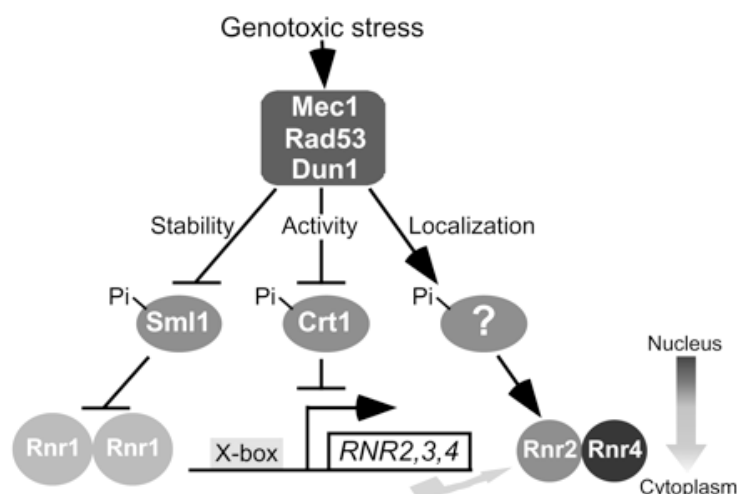


Figure I 9. Vue schématique des mécanismes de régulation de l'activité RNR par les checkpoints de l'ADN. Extrait de (Yao et al, 2003)

Mec1/Rad53/Dun1 augmentent l'activité de la RNR en réponse aux dommages de l'ADN ou à un stress réplcatif en induisant (i) la dégradation de Sml1, un inhibiteur de la RNR, (ii) la transcription des gènes *RNR2/3/4* et (iii) la relocalisation de Rnr2 et Rnr4 dans le cytoplasme.

3.6 Remodelage de la chromatine

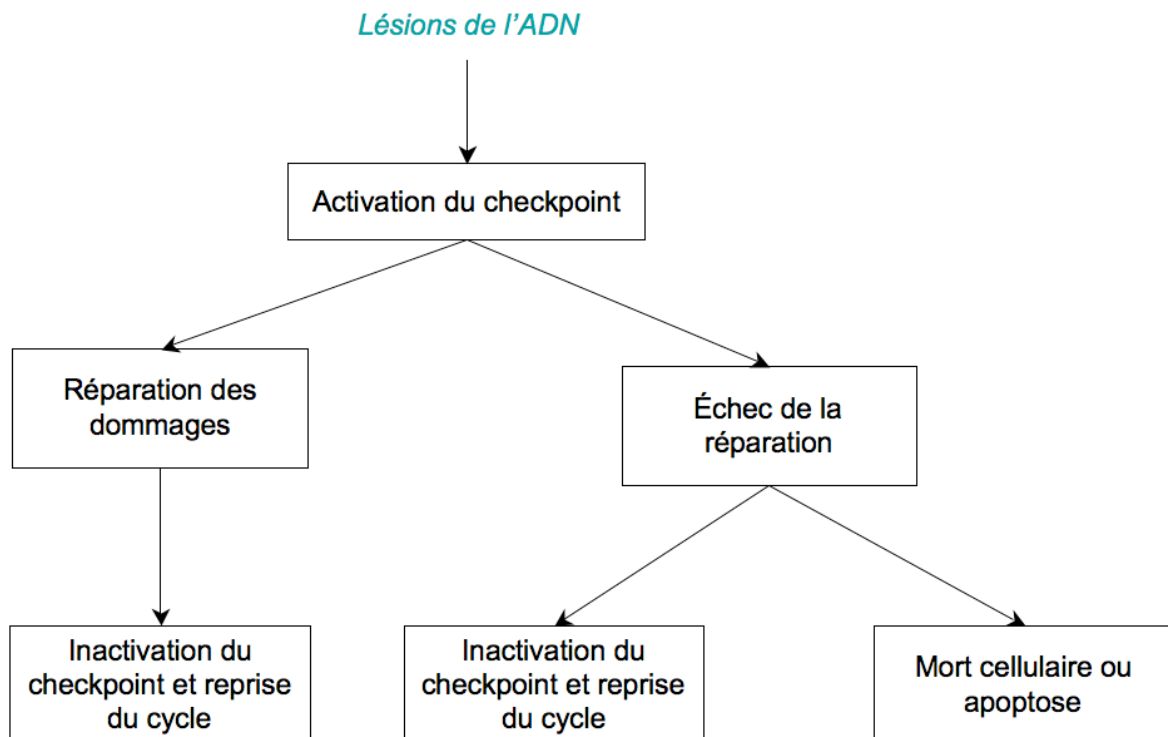
Des travaux récents imposent peu à peu le remodelage de la chromatine comme un composant à part entière de la réponse aux dommages (pour une revue, (Downs et al, 2007)). Des cassures double-brin de l'ADN provoquent par exemple une modification massive et étendue de la chromatine flanquant la lésion. La phosphorylation du variant d'histone H2AX (γ -H2AX) par les kinases de la famille ATM/ATR en cas de stress génotoxique contribue ainsi chez les mammifères à la réparation de l'ADN (Celeste et al, 2002; Celeste et al, 2003). Chez les levures *S. cerevisiae* et *S. pombe*, dépourvues d'H2AX, l'histone H2A est phosphorylé (Downs et al, 2000; Redon et al, 2003; Nakamura et al, 2004). Un rôle majeur de γ -H2A(X) est le recrutement des complexes de remodelage de la chromatine, qui vont probablement favoriser en retour l'accès des facteurs de réparation ou des checkpoints au niveau des lésions (Stucki & Jackson, 2006; Bartek & Lukas, 2007). Chez les mammifères, les histones H2A sont monoubiquitinylés au niveau des lésions de l'ADN en réponse à une irradiation aux UV. Cette modification coïncide avec la phosphorylation de H2AX et dépend également de la protéine des checkpoints ATR ; elle pourrait participer au remodelage de la chromatine (Bergink et al, 2006). Très récemment, il a été montré que certains complexes remodeleurs de la chromatine sont eux-mêmes des cibles des protéines des checkpoints (Morrison et al,

2007). En réponse à des cassures double-brin de l'ADN, ATM phosphoryle la protéine KAP1 qui favorise la relaxation de la chromatine nécessaire à la réparation des lésions (Ziv et al, 2006). D'autres modifications de la chromatine participent à l'activation ou au maintien des checkpoints, comme la monoubiquitinylation de l'histone H2B et la méthylation de la lysine 79 de l'histone H3 chez *S. cerevisiae* (Giannattasio et al, 2005; Wysocki et al, 2005), ou encore la méthylation de la lysine 20 de l'histone H4 chez la levure fissipare (Sanders et al, 2004).

La caractérisation minutieuse des réponses cellulaires à différents stress génotoxiques – tel type de réponse pour tel type de lésion de l'ADN, survenue à tel moment du cycle cellulaire – a mis en lumière, outre l'incroyable imbrication des différentes voies de la DDR, une régulation très fine de chacun de ses composants, qui permet d'orchestrer une réponse spécifique et appropriée à un dommage donné. Les protéines de checkpoint, comme nous l'avons vu, y sont pour beaucoup. Arrêts du cycle cellulaire, régulation des systèmes de réparation, de la RNR, remodelage de la chromatine... les checkpoints de l'ADN sont bel et bien au cœur, *le* cœur de la DDR.

3.7 Inactivation des checkpoints : rétablissement et adaptation

Une fois l'ADN réparé, les checkpoints sont inactivés et le cycle cellulaire reprend ; on parle de rétablissement, ou « recovery ». Cependant, les checkpoints sont également susceptibles d'être inactivés malgré la persistance de dommages, un processus appelé adaptation (**figure I 10**).



RÉTABLISSEMENT **ADAPTATION**

Figure I 10. Les phénomènes d'adaptation et de rétablissement (d'après C. Clémenson)

3.7.1 Rétablissement

Chez *S. cerevisiae*, l'inactivation des checkpoints en cas de recovery ou d'adaptation suit la cinétique de déphosphorylation de Rad53 (Pelliccioli et al, 2001). L'apparition des formes déphosphorylées de Rad53 ne dépend pas d'une synthèse protéique *de novo*, ce qui indique que les protéines Rad53 activées sont la cible d'un mécanisme de déphosphorylation (Tercero et al, 2003). Notre laboratoire a ainsi montré que 2 sérine/thréonine phosphatases, Ptc2 et Ptc3, participent directement à l'inactivation des checkpoints en déphosphorylant Rad53 (Leroy et al, 2003). Cette voie de régulation est conservée dans les cellules humaines : un des homologues humains de Ptc2 et Ptc3, la phosphatase 2C Wip1 codée par l'oncogène PPM1D, se lie à Chk2 et la déphosphoryle en réponse à un stress génotoxique (Oliva-Trastoy et al, 2007).

Récemment, O'Neill *et al.* ont montré que la phosphatase Php3 déphosphoryle également Rad53 (O'Neill et al, 2007). Surtout, les rôles de Ptc2/3 et Php3 ne semblent pas redondants : les mutants *ptc2* et *php3* ne sont pas hypersensibles aux mêmes stress génotoxiques et ne régulent pas les mêmes fonctions de Rad53 (Heideker et al, 2007). Tout comme il a été proposé que les phosphorylations de Rad53 soient spécifiques du type de dommages (voir paragraphe 2.4.3), il est possible que ces phosphatases reconnaissent spécifiquement différentes formes phosphorylées de Rad53, et contribuent à une régulation extrêmement fine de l'inactivation des checkpoints en coordination avec les autres voies de la réponse à un dommage donné (Travesa et al, 2008).

La reprise du cycle cellulaire ne se limite cependant pas à déphosphoryler Rad53. La déphosphorylation de l'histone γ -H2A(X) par Pph3 est également nécessaire au rétablissement après une cassure double-brin (Keogh et al, 2006). L'hélicase Srs2 est aussi requise pour inactiver le checkpoint, même si le mécanisme mis en jeu est incertain. On pense que Srs2 pourrait « éteindre » le signal d'activation des checkpoints en facilitant la dissociation de la chromatine des protéines qui en sont à l'origine (Vaze et al, 2002; Veaute et al, 2003). Le processus de rétablissement est ainsi un mécanisme actif, qui semble requérir la « réversion » des différentes étapes d'activation des checkpoints (Harrison & Haber, 2006).

3.7.2 Adaptation

Le processus d'adaptation a été essentiellement étudié chez *S. cerevisiae*. En présence d'une seule cassure double-brin irréparable, les cellules de levure subissent un arrêt du cycle de 12 à 14h, mais finissent par « s'adapter » et reprennent leur cycle cellulaire malgré la persistance d'un chromosome cassé (Sandell & Zakian, 1993; Toczyski et al, 1997; Lee et al, 1998). *Quid* du rôle originel des checkpoints de l'ADN d'empêcher la ségrégation de chromosomes endommagés au sein des cellules filles ? L'adaptation favorise l'instabilité génomique, notamment la perte de chromosomes et les translocations chromosomiques (Galgoczy & Toczyski, 2001). Elle est néanmoins nécessaire à la viabilité des levures en réponse à un dommage irréparable, peut-être en donnant à la cellule une nouvelle opportunité de réparer la lésion au cours du nouveau cycle ; des défauts d'adaptation empêchent l'inactivation de Rad53 et la rentrée dans le cycle, et conduisent à la lyse cellulaire (Toczyski et al, 1997). La quantité de dommages semble être un paramètre crucial dans l'adaptation, des cellules présentant deux cassures double-brin irréparables étant incapables de reprendre leur cycle (Lee et al, 1998). Longtemps, l'existence de l'adaptation a été considérée comme hautement improbable chez les métazoaires du fait de l'instabilité génomique qu'elle engendre. Des

travaux récents ont pourtant révélé son existence dans des extraits d'oeufs de Xénope (Yoo et al, 2004).

Tout comme pour le rétablissement, la déphosphorylation de Rad53 par Ptc2 et Ptc3 est un événement clé de l'adaptation (Leroy et al, 2003). D'autres facteurs sont nécessaires à l'adaptation à une cassure double-brin. Parmi eux, plusieurs protéines de la recombinaison homologue et de maturation d'une cassure double-brin (Rad51, Yku70, Yku80, Srs2 ou Rfa1) (Lee et al, 1998; Vaze et al, 2002; Lee et al, 2003a), ce qui suggère que la prise en charge de la cassure par ces protéines joue un rôle majeur dans le maintien de l'activation des checkpoints.

Des mutants de la polo-like kinase Cdc5, une cible de Rad53 (paragraphe 3.1.2.2), et de la protéine kinase CK2, impliquée dans la croissance et la prolifération cellulaire (Ackermann et al, 2001), présentent également des défauts d'adaptation (Toczyski et al, 1997). Bien que la fonction de Cdc5 dans ce processus soit encore mal comprise, notre laboratoire a montré récemment que CK2 est nécessaire à l'interaction de la phosphatase Ptc2 avec Rad53 (Guillemain et al, 2007).

4. Rad53 et la régulation des histones

Plusieurs études ont révélé un rôle de Rad53 dans la régulation des histones.

4.1 Rad53 et Asf1

En 2001, deux études ont montré que Rad53 forme un complexe avec le chaperon d'histone Asf1 et semble inhiber son activité d'assemblage de la chromatine (Emili et al, 2001; Hu et al, 2001a). En cas de stress génotoxique ou de blocage de la réplication, la forme hyperphosphorylée de Rad53 se dissocie d'Asf1 (Emili et al, 2001), qui peut alors participer à l'assemblage de la chromatine et permettre en particulier l'incorporation au sein des nucléosomes des histones H3 acétylés sur la lysine 56, indispensable à la réponse aux dommages de l'ADN (pour une revue, (Mousson et al, 2007)).

4.2 Rad53 et les histones

La létalité des mutants *mec1Δ* et *rad53Δ* peut être supprimée par la surexpression de la RNR ou l'inactivation de *SML1* (voir paragraphes 2.4.1 et 3.5.1). Cependant, de façon assez inattendue, le double mutant *rad53Δ sml1Δ* présente une croissance ralentie qui n'est pas retrouvée dans une souche *mec1Δ sml1Δ*, ce qui suggère que Rad53 a un (des) rôle(s) indépendant(s) de Mec1 au cours d'un cycle cellulaire non-perturbé (Zhao et al, 1998). En 2003, des travaux de Gunjan et Verreault ont montré que le phénotype de croissance ralentie du mutant *rad53Δ sml1Δ* est lié à une accumulation d'histones libres, et que Rad53, mais pas Mec1, contrôle les concentrations d'histones libres à la fois en absence et en présence de dommages de l'ADN (Gunjan & Verreault, 2003). Rad53 « surveille » le niveau d'histones libres en s'associant avec eux en un complexe dynamique modulé par son activité kinase, et induit la dégradation des histones en excès. Ce mécanisme de surveillance, indépendant de Mec1 et des chaperons d'histones connus comme Asf1, permet de réguler la quantité d'histones libres qui, en s'associant de façon non-spécifique avec la chromatine, pourraient interférer avec les différents processus qui requièrent un accès à l'ADN (Steger & Workman, 1999; Gunjan & Verreault, 2003). Il pourrait également expliquer un rôle potentiel de Rad53

dans l'initiation de la réplication, en affectant la structure de la chromatine au niveau des origines de réplication (Dohrmann & Sclafani, 2006).

5. Checkpoints, stabilité génomique et cancer

Compte tenu de leur rôle dans la stabilité génomique, il n'est pas surprenant que plusieurs études aient identifié des mutations de protéines de checkpoints dans des tumeurs sporadiques ou des syndromes de prédisposition au cancer chez l'homme (Shiloh, 2003). En particulier, des mutations de hCHK2, l'homologue humain de *RAD53*, prédisposent au cancer du sein et du colon (Falck et al, 2001; Sullivan et al, 2002). hCHK2 est donc considérée comme un suppresseur de tumeur *bona fide* et la cible potentielle de traitements anti-cancéreux (pour une revue, (Bartek & Lukas, 2003)). Des études récentes ont également montré que les checkpoints sont activés très tôt au cours de la tumorigénèse et pourraient former une barrière anti-cancéreuse en empêchant la progression tumorale (pour une revue, (Bartek et al, 2007)).

6. Conclusion

Cette introduction a eu pour but de présenter les mécanismes de surveillance de l'ADN, et en particulier de faire le bilan des interactions les plus étudiées et les mieux connues de la protéine kinase Rad53, protéine clé des checkpoints de l'ADN et cœur des études réalisées au laboratoire. Un récapitulatif de ces interactions est présenté sur la **figure I 11**.

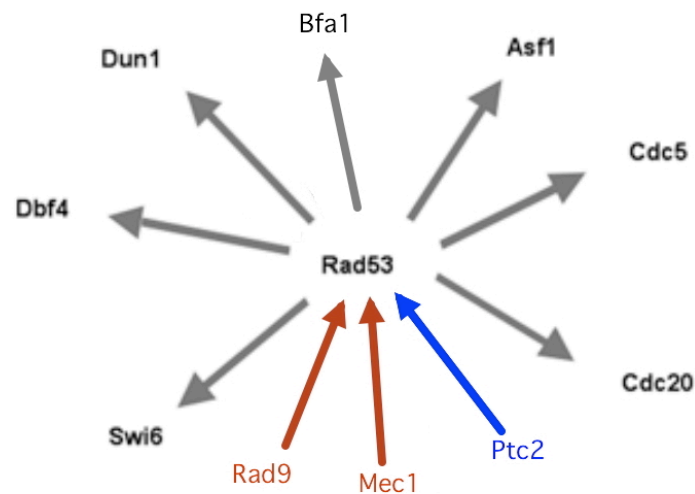


Figure I 11. Principales interactions de Rad53. Adapté de (Heideker et al, 2007)

Ce schéma récapitule les principales interactions et/ou substrats connus pour Rad53. Les flèches grises indiquent des cibles de Rad53, les flèches colorées correspondent à des régulateurs positifs (en rouge) ou négatifs (en bleu).

On constate ainsi que le nombre de cibles de Rad53 apparaît assez limité compte tenu de l'importance, tant qualitative que quantitative, des réponses cellulaires qu'elle contrôle. Même si de multiples questions subsistent encore sur les mécanismes d'activation et d'inactivation des checkpoints, mieux caractériser l'amplification du signal à partir des protéines kinases effectrices est indubitablement un objectif primordial dans notre compréhension de la réponse aux dommages, et un enjeu thérapeutique majeur. La spectaculaire émergence de la génomique et de la protéomique au cours de la dernière

décennie a été vue par beaucoup comme un moyen d'y parvenir. Les cribles visant à déterminer les réseaux d'interactions à l'échelle du génome se sont ainsi succédé et ont, comme attendu, démultiplié le nombre de partenaires potentiels des protéines de checkpoint. Chez l'homme, plus de 700 cibles des protéines kinases ATM et ATR ont été identifiées en réponse aux irradiations (Matsuoka et al, 2007) ! Le réseau d'interactions physiques de Rad53 a lui aussi été considérablement étendu (**figure I 12**) ; en plus de confirmer des interactions connues, il a permis de révéler de nouveaux rôles potentiels de Rad53, par exemple dans la régulation de la croissance cellulaire polarisée en réponse à un stress réplcatif (Smolka et al, 2006). Nous avons adopté au laboratoire une même approche globale, et j'ai réalisé au cours de ma thèse un crible génétique à l'échelle du génome chez *S. cerevisiae* pour identifier de nouveaux régulateurs et de nouvelles cibles de Rad53.

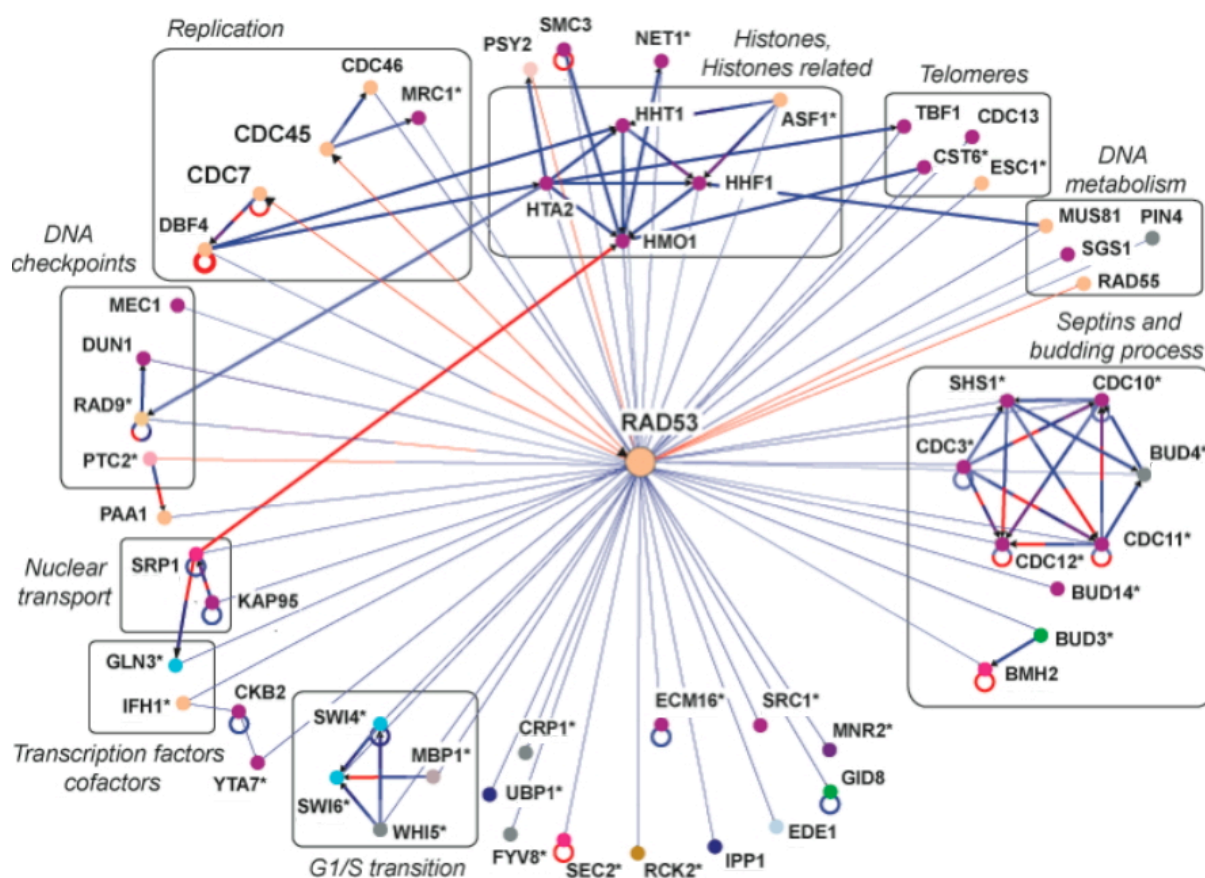


Figure I 12. Réseau des interactions physiques de Rad53. Adapté de (Aucher *et al.*, en préparation)

Traits rouges : interactions en double-hybride ; traits bleus : interactions détectées par purification par affinité ; traits gras : connexions observées indépendamment de Rad53 ; * : interactions avec le domaine FHA1 de Rad53.

2^{ème} partie : Le protéasome 26S : assemblage et fonctionnement

Le protéasome 26S est l'enzyme central du système de protéolyse ubiquitine-dépendante, mécanisme majeur de dégradation des protéines cytoplasmiques et nucléaires dans toutes les cellules eucaryotes. Une bien courte définition pour une bien longue histoire...

1. Prélude

Au début, il n'y avait rien. Ou plutôt, il n'y en avait que pour la synthèse. Comment le code génétique est transcrit en ARN, puis traduit en protéines, acteurs principaux des fonctions cellulaires. Malgré un manque d'intérêt certain de la part de la communauté scientifique, les indices d'une dégradation intracellulaire des protéines sélective, étendue et vitale pour la cellule se sont accumulés. La première étape vers la reconnaissance fut la découverte du lysosome par Christian de Duve au milieu des années 50. La découverte du système ubiquitine-dépendant de protéolyse par Aaron Ciechanover, Avram Hershko et Irwin Rose révolutionna la vision de la dégradation protéique intracellulaire : il apparut enfin que, tout comme leur synthèse, la destruction des protéines était un mécanisme complexe et hautement régulé, indispensable au fonctionnement de la cellule. Un nouveau monde.

1.1 Du lysosome...

Identifié dans les années 50 comme une structure vacuolaire riche en hydrolases acides (De Duve et al, 1953), le lysosome a très vite été considéré comme le candidat idéal pour assurer la dégradation des protéines intracellulaires. La séparation des protéases de leurs substrats par la membrane phospholipidique posait déjà les jalons d'une dégradation contrôlée ; il ne restait plus qu'à déterminer le mécanisme d'entrée des substrats à l'intérieur du lysosome où ils seront soumis à l'activité des protéases. Ce qui fut fait par ailleurs, révélant différents mécanismes d'internalisation de vésicules contenant les protéines (ou les organites) à dégrader. Admis pendant plus de vingt ans, le paradigme du lysosome comme machinerie principale de dégradation intracellulaire a peu à peu décliné. Plusieurs raisons à cela. Tout d'abord, la découverte progressive que la stabilité des protéines peut varier de plusieurs minutes à plusieurs jours (Schimke & Doyle, 1970; Goldberg & St John, 1976) ; de telles différences de demi-vie semblaient difficilement conciliables avec le mode d'action connu du lysosome censé digérer une fraction entière du cytoplasme à la même vitesse – pas vraiment un monument de sélectivité⁴. De plus, les observations de Simpson puis d'Hershko, entre autres, sur la dépendance énergétique de la machinerie de protéolyse intracellulaire étaient en opposition flagrante avec le mode d'action de toutes les protéases connues et notamment des protéases lysosomales qui, en conditions acides, dégradent les protéines de manière exergonique (Simpson, 1953; Hershko & Tomkins, 1971). Ce paradoxe énergétique suggérait l'existence d'un système de protéolyse régulée, qui utiliserait l'énergie métabolique de la cellule, c'est à dire l'ATP (Adénosine triphosphate), pour atteindre un haut degré de sélectivité de dégradation.

⁴ On ne (re)découvrira que plus tard le rôle du lysosome dans la dégradation sélective, y compris ubiquitine-dépendante, des protéines intracellulaires (pour une revue, (Piper & Katzmann, 2007)).

1.2 ...au système ubiquitine-dépendant de dégradation protéique...

Plusieurs étapes ont mené au rapprochement entre l'ubiquitine et la dégradation protéique. La découverte par Etlinger et Goldberg d'un système de protéolyse ATP-dépendante soluble à partir de réticulocytes, des cellules dépourvues de lysosomes, allait fournir des informations décisives en ce sens (Etlinger & Goldberg, 1977). En procédant à l'analyse par fractionnement biochimique d'extraits cellulaires de réticulocytes, Aaron Ciechanover, Avram Hershko et Irwin Rose ont alors isolé et purifié un facteur de 8,5kDa indispensable à la protéolyse ATP-dépendante dans ces extraits, qu'ils ont appelé APF1 (ATP-dependent Proteolysis Factor 1) (Ciechanover et al, 1978). Ils ont ensuite montré qu'une ou plusieurs molécules d'APF1 est attachée de façon covalente au substrat, que cette modification nécessite de l'ATP, et qu'elle est réversible (Ciechanover et al, 1980; Hershko et al, 1980). Les 3 futurs lauréats du Prix Nobel de Chimie en 2004 ont proposé un modèle dans lequel la modification ATP-dépendante d'une protéine par la liaison covalente d'APF1 entraîne sa dégradation par une protéase (non identifiée à cette époque) qui est incapable de reconnaître la protéine non-modifiée (**figure I 13A**). Un système de protéolyse sélective, donc.

Bien entendu, APF1 n'est autre que l'ubiquitine, la protéase inconnue le protéasome. L'ubiquitine, une petite molécule de 8,5kDa, doit son nom à un double malentendu : identifiée comme un facteur induisant la différenciation des lymphocytes et existant dans toutes les cellules vivantes, d'où l'acronyme UBIP (Ubiquitous Immunopoietic Polypeptide) (Goldstein et al, 1975), l'ubiquitine n'est ni impliquée dans la réponse immunitaire, ni ubiquitaire. Elle n'est retrouvée que chez les Eucaryotes, où elle est néanmoins extrêmement bien conservée (Ozkaynak et al, 1984). Avant même l'identification d'APF1 avait été découverte une forme de l'histone H2A liée de façon covalente à une ubiquitine, et la structure de ce conjugué analysée (Goldknopf & Busch, 1977). La taille d'APF1 et sa liaison covalente avec le substrat à dégrader ont très vite alimenté les suspicions, confirmées peu après : APF1 et l'ubiquitine ne sont qu'une seule et même protéine (Wilkinson et al, 1980). Notons par ailleurs que la mono-ubiquitylation des histones, dont le rôle commence seulement à être élucidé, n'entraîne pas leur dégradation par le protéasome (pour une revue, (Weake & Workman, 2008)). L'ironie de l'Histoire... Quoi qu'il en soit, l'énigme de la dépendance énergétique semblait résolue : cette énergie est utilisée pour créer la liaison isopeptidique de haute énergie entre l'ubiquitine et la protéine à dégrader (il sera montré plus tard que la dégradation par le protéasome requiert elle aussi de l'ATP). Ne restait plus alors qu'à identifier le mécanisme permettant la formation de cette liaison covalente. Ce fut chose faite par le laboratoire d'Hershko et Ciechanover qui découvrirent que l'ubiquitine n'est pas liée à son substrat par un enzyme mais par l'action séquentielle de trois enzymes différents (E1, E2, E3) (Ciechanover et al, 1982; Hershko et al, 1983). La découverte de l'enzyme E3, qui confère la spécificité de liaison à un substrat donné, apparut comme une solution crédible au problème de la grande hétérogénéité de stabilité des différentes protéines : elles pourraient être reconnues et ciblées pour la dégradation par des E3 spécifiques. De nombreuses études sur l'action sélective d'un grand nombre d'enzymes E3 sur des substrats spécifiques confirmèrent cette hypothèse, appuyées dans les années 90 par le séquençage de plusieurs génomes eucaryotes qui révéla l'existence de centaines d'enzymes E3.

En peu de temps, le modèle de dégradation ubiquitine-dépendante des protéines intracellulaires supplanta le modèle lysosomal. D'abord limité à des protéines anormalement repliées (Hershko et al, 1982), le système d'ubiquitylation fut rapidement étendu à la régulation de protéines « normales » à courte durée de vie (Finley et al, 1984). La fin des

années 1980 et le début des années 1990 virent l'émergence du contrôle par ubiquitinylation de protéines régulatrices majeures impliquées dans de nombreuses fonctions cellulaires (protéines du cycle cellulaire, facteurs de transcription, mais aussi suppresseurs de tumeurs, etc) (Hochstrasser & Varshavsky, 1990; Scheffner et al, 1990; Glotzer et al, 1991). On estime aujourd'hui que 80 à 90% des protéines d'une cellule sont dégradées de façon ubiquitine-dépendante – un système global, sélectif et vital.

1.3 ...au système ubiquitine-protéasome

Le Prix Nobel de Chimie attribué à Ciechanover, Hershko et Rose récompense « la découverte de la dégradation protéique médiée par l'ubiquitine ». Le protéasome semble curieusement absent de cet énoncé. Il est vrai que l'identification du chaînon manquant, la protéase capable de reconnaître et dégrader les substrats ubiquitinylés, résulte d'une approche très différente.

Tout a commencé avec la découverte par différents laboratoires de particules de très haut poids moléculaire possédant une activité protéolytique ; dénommées « protéase alcaline » (Hase et al, 1980), « protéinase yscE » chez la levure (Achstetter et al, 1984) ou « complexe protéase multicatalytique » (Wilk & Orłowski, 1983), ces particules avaient toutes en commun une forme cylindrique, un coefficient de sédimentation de 20S, une masse moléculaire voisine de 700kDa et étaient formées de multiples sous-unités. Le terme « protéasome » est apparu en 1988 pour désigner la particule 20S quand il fut démontré que le complexe protéase multicatalytique et le prosome, un complexe partageant les mêmes caractéristiques physico-chimiques mais que l'on supposait impliqué dans la traduction, ne faisaient qu'un (Arrigo et al, 1988; Falkenburg et al, 1988).

Une avancée cruciale dans le rapprochement entre le système ubiquitine et le protéasome a été réalisée par Hough et ses collaborateurs en 1986. Ces derniers ont partiellement purifié, à partir de lysats de réticulocytes, une protéase de très haut poids moléculaire qui dégrade, de façon ATP-dépendante, le lysozyme conjugué à l'ubiquitine, mais pas le lysozyme seul (Hough et al, 1986). A peine un an plus tard, la même équipe et le laboratoire de Goldberg identifiaient cette fois 2 protéases de grande taille à partir de réticulocytes. La première, gigantesque (1,5MDa, coefficient de sédimentation 26S), est responsable de la dégradation ATP-dépendante des conjugués ubiquitinylés. La deuxième protéase a une masse moléculaire de 670kDa, un coefficient de sédimentation 20S et son activité ne dépend pas de l'ATP (Hough et al, 1987; Waxman et al, 1987). Elle est similaire, si ce n'est identique, au complexe protéase multicatalytique – à l'anachronique protéasome. Surtout, Hough *et al.*, sans la démontrer, émettent l'hypothèse que le 20S et le 26S puissent dériver l'un de l'autre (Hough et al, 1987). D'autres s'en chargeront, qui montreront que le 20S est la partie catalytique du complexe 26S de dégradation ATP-dépendante des protéines ubiquitinylées (Eytan et al, 1989; Driscoll & Goldberg, 1990). Ce n'est pourtant qu'en 1992 qu'Hoffman *et al.* démontreront que le protéasome 20S s'associe à un second complexe protéique, future particule régulatrice ou 19S (poétiquement appelée la « boule » à cette époque, par opposition au « cylindre » du 20S) pour former la protéase 26S active (Hoffman et al, 1992).

Il faudra encore quelques années pour que s'harmonisent les notions de complexe protéase multicatalytique, protéasome 20S et protéasome 26S (c'est désormais à ce complexe que le terme « protéasome » renvoie), mais le système ubiquitine-protéasome de dégradation sélective des protéines était enfin complet (**figure I 13B**).

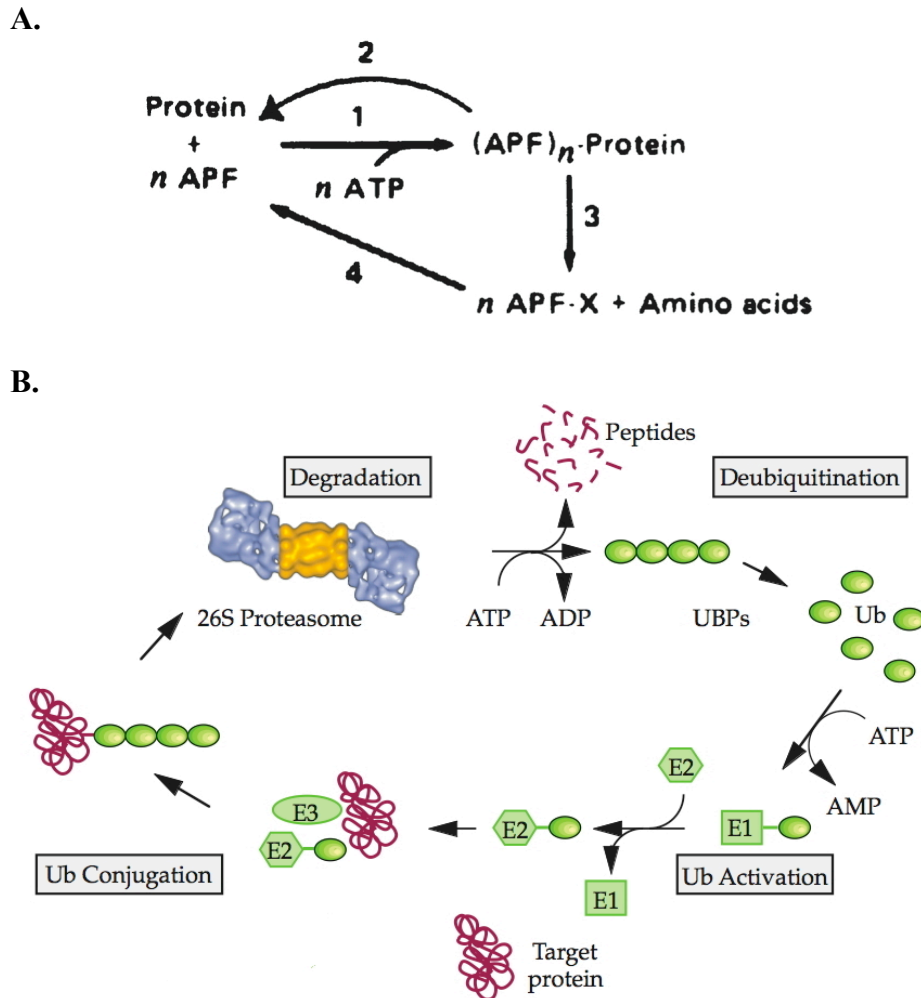


Figure I 13. Le système de dégradation protéique ubiquitine-dépendant des origines à nos jours

A. Le modèle de dégradation sélective APF1-dépendant. Extrait de (Hershko et al, 1980).

Le modèle original de dégradation sélective des protéines *via* la liaison à APF1 est étonnamment proche de la vision actuelle de l'UPS. L'identification des enzymes responsables de l'ubiquitinylation des protéines (E1, E2, E3) et de la protéase capable de reconnaître et dégrader les protéines ubiquitinylées, le protéasome 26S, sont les deux avancées majeures. Mais les étapes d'attachement au substrat de plusieurs molécules d'APF1 (étape 1, correspondant aux étapes d'activation et de conjugaison de l'ubiquitine) puis de dégradation par un enzyme capable de reconnaître spécifiquement les substrats liés à APF1 (étape 3/étape de dégradation), enfin le recyclage d'APF1 (étape 4/étape de déubiquitinylation) sont déjà là. Ces étapes sont présentées en détails au cours de l'introduction. Etape 2 : étape de « correction » par une amidase si seules une ou deux molécules d'APF1 sont liées à la protéine (l'ancêtre du processus « d'editing » ? Voir paragraphe 3.6.6.2). Etape 4 : X est une lysine ou un petit peptide (cet aspect du modèle est le seul à avoir été invalidé depuis).

B. Le système ubiquitine-protéasome. Adapté de (Voges et al, 1999).

La particule catalytique (20S) du protéasome 26S, en orange, est associée à 2 particules régulatrices (19S), en bleu.

1.4 Fin du prélude

Inactiver un processus est tout aussi important que l'activer. Dégrader une protéine tout aussi important que la synthétiser. Dans ce but, un mécanisme unique de régulation est apparu au cours de l'évolution ; unique par sa sélectivité, unique par sa complexité, unique par son étendue. Le système ubiquitine-protéasome (ou UPS, Ubiquitin-Proteasome System) contrôle la destruction des protéines intracellulaires et, en conséquence, il est essentiel à la vie de la cellule. Maintien de l'homéostasie, « contrôle qualité » des protéines, transduction du signal,

réponse au stress, transcription, contrôle du cycle cellulaire, apoptose, différenciation, réponse immunitaire... rares sont les fonctions cellulaires qui échappent à l'UPS (pour une revue des fonctions de l'UPS, (Hershko & Ciechanover, 1998; Glickman & Ciechanover, 2002; Wolf & Hilt, 2004)). Chez l'Homme, compte tenu de la diversité des processus régulés, des défauts dans la voie de protéolyse ubiquitine-dépendante sont la cause de nombreuses pathologies (cancers, désordres neurologiques ou métaboliques, maladies inflammatoires...), et font de l'UPS une cible thérapeutique majeure (pour une revue, (Goldberg, 2007)).

Il est cependant apparu au cours des dix dernières années que l'ubiquitine et le protéasome, aussi liés soient-ils, peuvent agir chacun indépendamment, et on distingue de plus en plus les deux composants de l'UPS. Ainsi, l'ubiquitylation n'a plus pour seul rôle d'éteindre définitivement la fonction d'une protéine en provoquant sa dégradation irréversible par le protéasome ; il existe au contraire différents types d'ubiquitylation, qui constituent autant de modifications post-traductionnelles influençant différemment le devenir du substrat. Et de même que l'ubiquitine ne fait pas que cibler des protéines vers le protéasome, des données récentes indiquent que le protéasome ne fait pas que dégrader les protéines ubiquitylées. Et qu'il n'y a en fait pas *un*, mais *des* protéasomes⁵. Dont le fonctionnement est complexe, régulé. Nous essaierons d'être clairs.

Les travaux réalisés au cours de ma thèse ont essentiellement concerné les protéasomes 20S et 26S, et plus particulièrement leur assemblage. C'est donc sur ce point que nous insisterons au cours de cette introduction « mécanistique ». Le rôle fondamental du protéasome 26S étant de dégrader les protéines préalablement polyubiquitylées, nous commencerons par présenter ce processus.

2. Ubiquitine et dégradation protéique ubiquitine-dépendante

2.1 L'ubiquitine

L'ubiquitine est une petite protéine de 76 acides aminés présente chez tous les eucaryotes. Ne différant que pour 3 résidus entre la levure *S. cerevisiae* et les métazoaires, elle est même très probablement l'une des mieux conservées de toutes les protéines connues (Ozkaynak et al, 1984). L'ubiquitine est synthétisée sous la forme de 3 précurseurs (au moins) : un concatémère de plusieurs molécules d'ubiquitine appelé polyubiquitine (Ozkaynak et al, 1984), et 2 protéines, UbL40 et UbS27, associant un monomère d'ubiquitine fusionné respectivement aux protéines ribosomiques L40 et S27 (Ozkaynak et al, 1987; Finley et al, 1989; Baker & Board, 1991). Des endopeptidases spécifiques, les enzymes de déubiquitination, clivent ces précurseurs pour libérer les monomères d'ubiquitine (Amerik & Hochstrasser, 2004). Avant cette étape de protéolyse, les molécules UbL40 et UbS27 semblent également jouer un rôle de chaperon du polypeptide ribosomal auquel elles sont associées, et faciliter ainsi l'assemblage des ribosomes (Finley et al, 1989). Certains eucaryotes expriment d'autres fusions ubiquitine-protéine (Archibald et al, 2003), et le nombre de répétitions d'ubiquitine au sein de la polyubiquitine varie selon les organismes (Tachikui et al, 2003). Il a néanmoins été montré chez *S. cerevisiae* que l'inactivation du gène *UBI4* codant la polyubiquitine peut être compensée par l'expression d'un « minigène » codant une seule molécule d'ubiquitine, ce qui suggère que la fonction du précurseur est de fournir

⁵ Au cours de cette étude, sauf indication contraire, « le protéasome » renverra au protéasome 26S. Le poids des habitudes...

des monomères matures d'ubiquitine et non la polyubiquitine en tant que telle (Finley et al, 1987). Le nombre de gènes de polyubiquitine et d'hybrides ubiquitine-protéine ribosomique par génome varie considérablement parmi les eucaryotes ; cependant, tous les membres de cette famille multigénique codent la même séquence polypeptidique pour l'ubiquitine au sein d'un même organisme (Nei & Rooney, 2005).

Sa séquence primaire dévoile deux caractéristiques fondamentales de l'ubiquitine : la présence de 7 lysines réparties tout au long de la protéine (K6/K11/K27/K29/K33/K48/K63) et celle d'un motif diglycine carboxy-terminal. Comme nous le verrons par la suite, ces résidus sont cruciaux pour assembler des polymères d'ubiquitine liés de façon covalente au substrat. De plus, la multiplicité des lysines offre la possibilité de générer une grande variété de chaînes d'ubiquitine, soit autant de signaux spécifiques de régulation du substrat (voir paragraphe 2.2.4).

La structure de l'ubiquitine a été résolue par cristallographie et RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) (Di Stefano & Wand, 1987; Vijay-Kumar et al, 1987; Weber et al, 1987). L'ubiquitine a une structure globulaire très compacte et stable caractérisée par un repliement spécifique SSHSSS qui comprend 5 feuillets β (S, Strand)) enroulés autour d'une hélice α (H, Helix) (**figure I 14**). L'ubiquitine est le membre fondateur d'une famille de protéines partageant ce repliement caractéristique, les UBL (Ubiquitine-Like protein, comme par exemple la protéine SUMO, Small Ubiquitin-like Modifier), qui régulent une grande variété de fonctions cellulaires. L'ubiquitine est le membre le plus éminent et le mieux caractérisé, le « prototype » des UBL, auxquelles peuvent être étendus, au moins en partie, les mécanismes biochimiques décrits pour l'ubiquitine. Enfin, précisons que les procaryotes, même s'ils ne possèdent pas d'analogues fonctionnels de l'ubiquitine, contiennent en revanche des protéines (ThiS, MoaD) qui présentent la même conformation que l'ubiquitine et en sont les ancêtres probables (pour une revue sur les UBL, (Kerscher et al, 2006)).

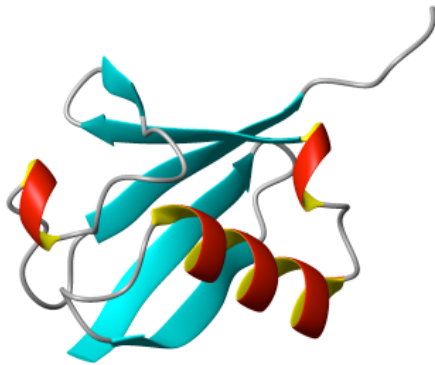


Figure I 14. Structure de l'ubiquitine

L'ubiquitine a une structure globulaire compacte caractérisée par un repliement spécifique SSHSSS qui comprend 5 feuillets β (en bleu) enroulés autour d'une hélice α (en rouge).

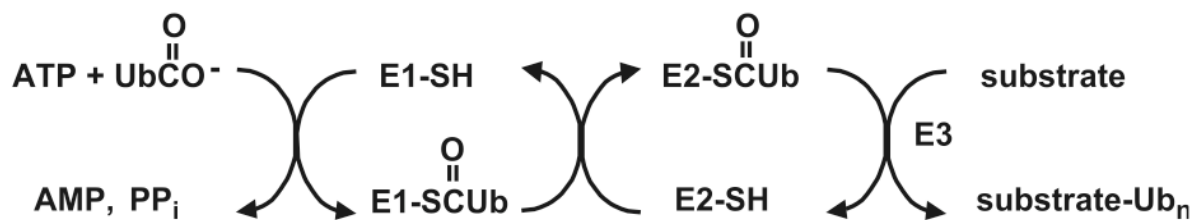
2.2 L'ubiquitinylation

2.2.1 Conjugaison de l'ubiquitine au substrat

Hershko et Ciechanover ont montré que l'action séquentielle de trois classes d'enzymes, E1, E2 et E3, est requise pour lier l'ubiquitine à son substrat (Ciechanover et al, 1982; Hershko et al, 1983). Une molécule d'ubiquitine est tout d'abord activée pour le transfert *via* la formation ATP-dépendante d'une liaison thioester avec l'enzyme d'activation de l'ubiquitine, ou E1. L'ubiquitine activée est ensuite transférée, en formant une autre liaison thioester, à un E2, enzyme de conjugaison (aussi appelé UBC pour Ubiquitin Conjugating enzyme). Au cours de

la dernière étape, catalysée par une ubiquitine-ligase (E3), l'ubiquitinylation du substrat est réalisée par la formation d'une liaison isopeptidique entre le groupe carboxyl de la glycine terminale de l'ubiquitine et le groupe amine d'un résidu lysine du substrat (**figure I 15A**) (Hershko & Ciechanover, 1998). Après la liaison de la première ubiquitine au substrat, la création (facultative) d'une chaîne de polyubiquitine procède par formation d'une liaison isopeptidique entre le groupement amine d'une lysine de l'ubiquitine « n » et le groupe carboxyl de la glycine 76 de l'ubiquitine « n+1 ». Il est communément admis que les chaînes d'ubiquitine contiennent un seul type de liaison isopeptidique (Chau et al, 1989; Gregori et al, 1990) (un « dogme » récemment remis en cause, voir paragraphe 2.2.4). L'ubiquitine contenant 7 lysines, 7 types de liaisons isopeptidiques inter-ubiquitine sont susceptibles, en théorie, d'être formées. Une liaison *via* la lysine 48 est impliquée pour le ciblage au protéasome (Chau et al, 1989; Finley et al, 1994). On distingue généralement 2 modes d'ubiquitinylation d'une protéine. Dans le premier cas, minoritaire, l'enzyme E2 transfère l'ubiquitine à la ligase E3 qui assure la conjugaison au substrat ; c'est le cas des enzymes E3 à domaine HECT (Homologous to E6 Associated Protein Carboxy Terminus). Au contraire, tous les autres E3 connus, regroupés au sein de la superfamille des E3 à domaine RING (Really Interesting New Gene) fonctionnent de manière non catalytique en associant l'E2 avec le substrat pour permettre le transfert de l'ubiquitine (Pickart & Eddins, 2004) (**figure I 15B**). Enfin, en 1999, Koegl *et al.* ont identifié un nouveau type d'enzyme, E4, impliqué dans l'élongation de certaines chaînes d'ubiquitine (Koegl et al, 1999).

A.



B.

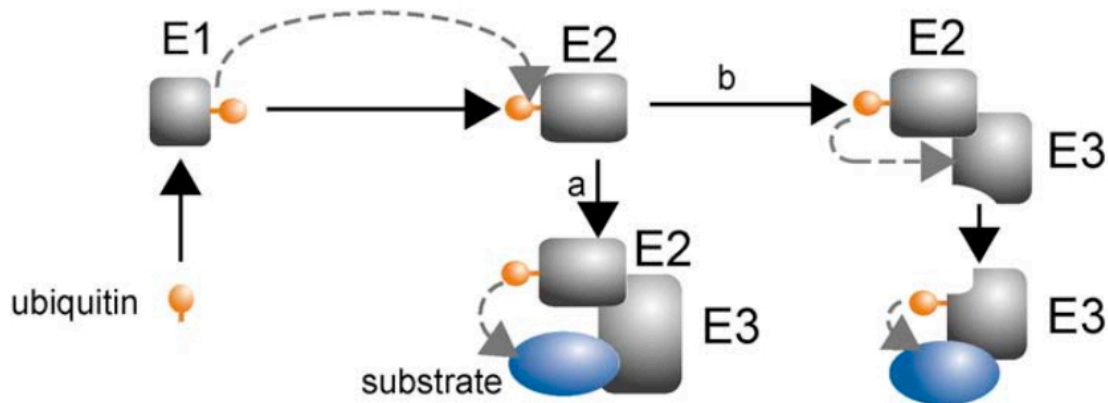


Figure I 15. Séquence des réactions enzymatiques d'ubiquitinylation

A. Etapes de la modification du substrat par l'ubiquitine. Extrait de (Pickart & Eddins, 2004).

B. La majorité des E3 connus fonctionnent de manière non catalytique en associant l'E2 avec le substrat pour permettre le transfert de l'ubiquitine (voie a). Dans certains cas, l'enzyme E2 transfère l'ubiquitine à la ligase E3 qui assure la conjugaison au substrat (voie b). Adapté de (Wolf & Hilt, 2004).

2.2.2 Diversité ET spécificité de l'ubiquitylation

La caractéristique la plus marquante du système d'ubiquitylation des protéines est l'extraordinaire diversité de ses substrats, à l'origine du large spectre de fonctions cellulaires régulées. Compte tenu des effets délétères que pourrait entraîner une ubiquitylation non-spécifique des protéines, notamment dans le cas d'une dégradation irréversible par le protéasome, il est indispensable d'assurer la sélectivité de ce système. Comment réconcilier diversité et spécificité ? Grâce aux ubiquitine-ligases, et à leur importance quantitative. Les cellules eucaryotes expriment un seul enzyme E1⁶, plusieurs enzymes de conjugaison E2 et de très nombreuses ubiquitine-ligases E3. On recense par exemple 25 gènes codant des E2 chez les mammifères, pour plusieurs centaines d'E3 (Zhang & Matunis, 2005). Si toutes les protéines à domaine RING identifiées grâce au séquençage du génome humain sont effectivement des E3, le nombre total d'E3 chez l'homme pourrait être estimé à plus d'un millier (Pickart & Eddins, 2004) ! En permettant le transfert final de l'ubiquitine sur un substrat donné, les E3 sont à l'origine de la spécificité du marquage des protéines par l'ubiquitine ; leur nombre explique l'incroyable diversité des protéines régulées. On représente souvent la cascade des réactions de conjugaison de l'ubiquitine sous la forme d'un modèle en pyramide où, à partir d'un E1, plusieurs centaines de substrats sont spécifiquement ubiquitylés (**figure I 16**). Les signaux d'ubiquitylation reconnus par les E3 incluent (i) des séquences polypeptidiques (acides aminés N-terminaux basiques et hydrophobes, « destruction box », motifs riches en proline PPXY...) et (ii) des éléments structuraux spécifiques reconnus par les domaines d'interaction protéine-protéine portés par certains E3. Compte tenu du nombre de substrats ubiquitylés, les motifs protéolytiques connus correspondent probablement à une infime partie des signaux d'ubiquitylation existant (pour une revue, (Glickman & Ciechanover, 2002; Pickart & Eddins, 2004)).

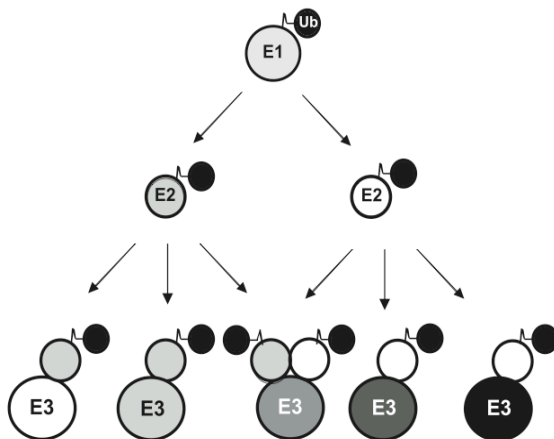


Figure I 16. Représentation schématique de la cascade de conjugaison de l'ubiquitine. Extrait de (Pickart & Eddins, 2004)

Chez les mammifères, il y a un E1, 25 E2 et plusieurs centaines d'E3. E1 interagit avec tous les E2. Un même E2 peut s'associer avec plusieurs E3, et un E3 peut interagir avec plusieurs E2. La spécificité de substrat dépend en grande partie de l'identité de l'E3, mais peut donc aussi être influencée par l'E2.

2.2.3 Régulation de l'ubiquitylation

La reconnaissance d'un substrat spécifique est l'objectif final de la cascade d'ubiquitylation et la raison d'être des E3. La formation du couple E3-substrat constitue par là même un niveau privilégié de régulation, même si des mécanismes de contrôle existent aussi pour les

⁶ A l'exception notable des plantes, où plusieurs E1 ont été décrits (Hatfield et al, 1997) ; Jin *et al.* ont récemment identifié un deuxième enzyme E1 conservé chez les vertébrés et l'oursin (Jin et al, 2007).

enzymes E1 et E2 (par exemple, (Plafker et al, 2004; Zhang & Matunis, 2005)). De très nombreux travaux ont documenté la diversité des mécanismes contrôlant les interactions entre les ubiquitine-ligases et leurs substrats, incluant des modifications post-traductionnelles de l'enzyme et/ou du substrat, le contrôle de leur localisation cellulaire ou encore l'intervention de protéines auxiliaires (pour une revue, (Hershko & Ciechanover, 1998; Glickman & Ciechanover, 2002; Pickart & Eddins, 2004). Nous avons ainsi vu dans la première partie de l'introduction consacrée aux checkpoints qu'en réponse aux dommages de l'ADN, l'hyperphosphorylation de Pds1, un inhibiteur de l'anaphase, par la protéine des checkpoints Chk1 empêche son ubiquitinylation par le complexe E3 APC/C, et donc sa dégradation par le protéasome 26S, ce qui entraîne l'arrêt du cycle à la transition G2/M (Sanchez et al, 1999). Un exemple révélateur du dialogue cellulaire entre différentes voies de signalisation.

2.2.4 L'ubiquitine, un signal multifonctionnel

L'ubiquitine porte bien son nom, en définitive : de par l'étendue de ses substrats (Peng et al, 2003), elle régule presque toutes les fonctions cellulaires chez les eucaryotes – en un mot, elle a un rôle ubiquitaire. Cette régulation ne repose pas uniquement sur le ciblage au protéasome, loin s'en faut. L'étude pionnière de Chau *et al.* a révélé que la chaîne de polyubiquitine nécessaire à la dégradation d'un substrat modèle, la β -galactosidase, était constituée de branchements au niveau de la lysine 48, Finley *et al.* confirmant par la suite que ces chaînes sont bel et bien le principal signal de protéolyse (Chau et al, 1989; Finley et al, 1994). Mais depuis, d'autres types de liaisons inter-ubiquitine, qui plus est sans fonction protéolytique, ont été mis en évidence. Arnason et Ellison puis Spence *et al.* ont fourni les premières preuves de la versatilité du signal ubiquitine en montrant que différentes configurations de chaîne assurent différentes fonctions (Arnason & Ellison, 1994; Spence et al, 1995). Ainsi, des cellules de levure exprimant un mutant de l'ubiquitine où la lysine 63 a été remplacée par une arginine présentent des défauts de réparation de l'ADN mais sont compétents pour la protéolyse (Spence et al, 1995). Des études par spectrométrie de masse ont récemment retrouvé *in vivo* les 7 types de liaisons isopeptidiques théoriques entre des molécules d'ubiquitine, et identifié des structures de chaîne encore plus complexes contenant par exemple plusieurs types de liaisons inter-ubiquitines ou formant des fourches (Peng et al, 2003; Kim et al, 2007; Xu & Peng, 2008). La polyubiquitinylation n'est de plus pas le seul mode de conjugaison de l'ubiquitine : la monoubiquitinylation d'un substrat (en l'occurrence des histones H2A et H2B) est même la première modification d'une protéine par l'ubiquitine à avoir été décrite (Goldknopf & Busch, 1977). A noter que plusieurs résidus d'une même protéine peuvent être simultanément monoubiquitinylés ; on parle alors de multiubiquitinylation.

En conclusion, la liaison d'une seule ubiquitine ou d'une chaîne de polyubiquitine donnée (selon la lysine utilisée comme site de liaison entre les monomères d'ubiquitine) permettent de générer différents signaux affectant spécifiquement le devenir du substrat. Les principales modifications par l'ubiquitine connues ainsi que leurs rôles sont présentés dans le **tableau I 2**.

Type de modification		Rôle(s)
Monoubiquitinylation		Endocytose et adressage des protéines (Dupre et al, 2004; Mukhopadhyay & Riezman, 2007; Piper & Katzmann, 2007)
		Réponse aux dommages de l'ADN (Gregory et al, 2003; Giannattasio et al, 2005; Bergink et al, 2006; Moldovan et al, 2007)
		Localisation (Brooks & Gu, 2006)
		Stimulation de facteurs de transcription (Salghetti et al, 2001)
		Expression des gènes/silencing (Weake & Workman, 2008)
Polyubiquitinylation	K6	Ciblage au protéasome non-protéolytique ? (Nishikawa et al, 2004)
	K11	Ciblage au protéasome ? (Baboshina & Haas, 1996)
	K27	Auto-régulation de l'activité ubiquitine ligase ? (Ben-Saadon et al, 2006)
	K29	Signal de recrutement d'un E4 pour ciblage au protéasome ? (Koegl et al, 1999)
	K33	Chaînes E4-spécifiques ? (Hatakeyama et al, 2001)
	K48	Ciblage au protéasome (Chau et al, 1989; Finley et al, 1994) Inactivation de facteurs de transcription (Flick et al, 2004)
	K63	Réponse aux dommages de l'ADN (Moldovan et al, 2007; Yan & Jetten, 2008) Trafic intracellulaire (Dupre et al, 2004; Mukhopadhyay & Riezman, 2007; Piper & Katzmann, 2007) Synthèse des protéines ribosomiques (Spence et al, 2000) Activation de protéines kinases impliquées dans la réponse inflammatoire (Kanayama et al, 2004; Sun et al, 2004; Zhou et al, 2004)

Tableau I 2. Types de modifications des protéines par l'ubiquitine et leurs rôles

Les chaînes K48 et K63 sont les chaînes les plus abondantes et dont les rôles sont les mieux décrits. Les chaînes K11 sont également très abondantes, mais leur(s) fonction(s) reste(nt) à déterminer.

3. Protéasome 26S

3.1 Généralités

Le protéasome 26S est l'enzyme central du système de protéolyse ubiquitine-dépendante (**figure I 13**). Le protéasome est une nanomachine protéolytique ultra-sophistiquée composée de plus de 40 sous-unités, et représente de 1 à 2% des protéines totales d'une cellule à métabolisme actif ! Ce mastodonte biologique est formé par l'association de 2 sous-complexes : un cœur catalytique, la particule 20S ou Core Particle (CP) renfermant les activités protéolytiques, et un complexe régulateur, le 19S (encore appelé RP pour Regulatory Particle, PA700 chez les mammifères ou particule μ chez la drosophile) responsable de la reconnaissance des substrats marqués d'une chaîne de polyubiquitine K48, de leur dépliement et de leur translocation dans le 20S, ainsi que de leur déubiquitinylation (Coux et al, 1996; Voges et al, 1999; Wolf & Hilt, 2004) (**figure I 17**).

La dégradation par le protéasome 26S des protéines polyubiquitinylées peut intervenir dans le noyau comme dans le cytoplasme, ou encore à la surface du reticulum endoplasmique (Wolf & Hilt, 2004). Le protéasome est également capable de dégrader certaines protéines non-ubiquitinylées (pour une revue, (Jariel-Encontre et al, 2008) et voir paragraphes 3.6.2.2.4 et 3.6.3.4), mais aussi de *ne pas* dégrader en totalité certains substrats (cette dégradation ménagée permet la maturation de plusieurs protéines, voir paragraphe 3.6.5.2).

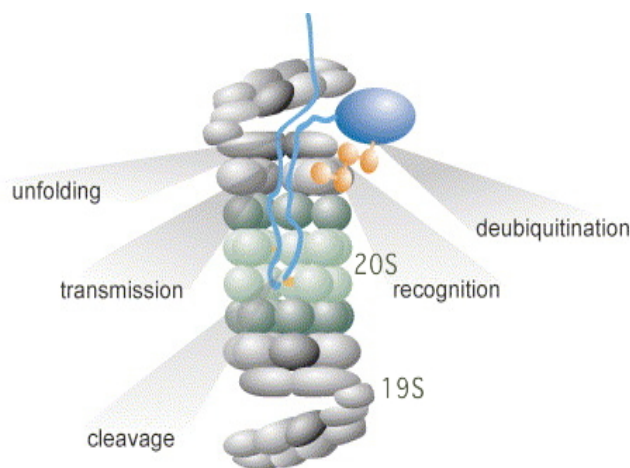


Figure I 17. Processus exécutés par le protéasome 26S. Adapté de (Wolf & Hilt, 2004)

Les substrats du protéasome (en bleu) sont en général reconnus *via* leur chaîne de polyubiquitine K48 (en jaune) par la particule régulatrice 19S, qui va assurer le dépliement du substrat et sa translocation dans la chambre protéolytique du 20S où il sera dégradé. La chaîne de polyubiquitine est clivée au cours de ce processus. Le 20S peut être associé à une ou 2 particules régulatrices.

Tout comme l'ubiquitine, le protéasome 26S est très conservé chez les eucaryotes. La majorité de ses sous-unités présente plus de 40% d'identité entre la levure *S. cerevisiae* et l'homme, ce taux dépassant même les 70% pour certaines sous-unités de la RP. Cette conservation est aussi fonctionnelle : dans la grande majorité des cas, des mutants du protéasome chez la levure voient leur fonction restaurée en exprimant les homologues humains des sous-unités mutées – on parle d'hétérocomplémentation (Glickman & Ciechanover, 2002).

Alors qu'il a mis du temps à s'imposer, le concept de protéasome pour désigner le complexe multiprotéique 26S responsable de la protéolyse ubiquitine-dépendante est appelé aujourd'hui à évoluer ; de nombreuses études ont en effet révélé l'existence de particules régulatrices et catalytiques alternatives, ainsi que de rôles spécifiques pour chacun des sous-complexes du protéasome, et on parle désormais *des* protéasomes en lieu et place *du* protéasome.

3.2 Protéasome 20S

Le 20S correspond au complexe protéase multicatalytique de très haut poids moléculaire (700kDa) et de coefficient de sédimentation 20S qui prit le nom de protéasome en 1988. Il est présent dans les 3 règnes du Vivant et est ubiquitaire chez les eucaryotes et les archéobactéries, avec une architecture conservée (Groll et al, 2005).

3.2.1 Structure du protéasome 20S

Le 20S est un complexe de très grande taille (160Å de long pour 120Å de diamètre) en forme de cylindre allongé creux. Il est composé de 28 sous-unités réparties en 4 anneaux heptamériques superposés (Groll et al, 2005). La résolution de la structure par cristallographie aux rayons X du protéasome 20S de l'archéobactérie *Thermoplasma acidophilum* (Lowe et al, 1995) puis du 20S de *S. cerevisiae* (Groll et al, 1997) a permis de détailler très précisément l'architecture du 20S. Les 2 anneaux centraux sont constitués de 7 sous-unités β et les 2 anneaux extérieurs sont formés de 7 sous-unités α , donnant une configuration $\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$ au CP le long d'un axe vertical. Les 2 anneaux α sont identiques, tout comme les 2 anneaux β . Le 20S de l'archéobactérie *T. acidophilum* est formé à partir d'un seul type de sous-unité α et un type de sous-unité β . Au contraire, les 20S eucaryotes contiennent 7 types différents de sous-unités α ($\alpha 1-7$) et β ($\beta 1-7$) (Heinemeyer et al, 1994) ayant probablement divergé des 2 sous-unités archéobactériennes (Volker & Lupas, 2002). Le 20S des archéobactéries pourrait être considéré comme le prototype des CP eucaryotes dont l'architecture plus complexe consiste en 2 parties identiques $\alpha_{1-7}\beta_{1-7}/\beta_{1-7}\alpha_{1-7}$ reliées par une symétrie cyclique C2 (Groll et al, 1997) (**figure I 18**). La nomenclature utilisée chez les eucaryotes a été définie par rapport aux données structurales du CP de *S. cerevisiae* (Groll et al, 1997).

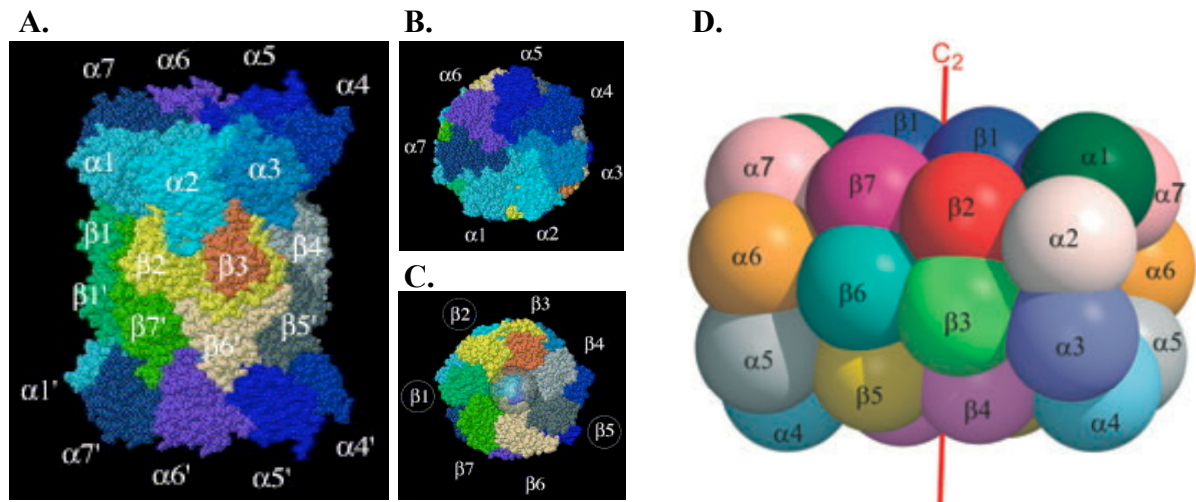


Figure I 18. Structure du protéasome 20S de *S. cerevisiae*

A. Le 20S est formé de 4 anneaux heptamériques. Les 2 anneaux externes sont composés de 7 sous-unités α différentes, les 2 anneaux centraux de 7 sous-unités β distinctes.

B. Protéasome 20S vu du dessus.

C. Coupe transversale du protéasome 20S au niveau de l'anneau β . Les 3 sous-unités catalytiques ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 5$) sont entourées.

A., B. et C. adaptés de (Wolf & Hilt, 2004).

D. Topologie des 28 sous-unités du protéasome 20S représentées sous forme de sphères. Extrait de (Groll et al, 2005).

3.2.2 Chambre catalytique du protéasome 20S

Les analyses structurales ont montré que le cylindre 20S contient trois cavités continues (Groll et al, 1997) : 2 cavités distales formées conjointement par un anneau α et un anneau β , et une cavité centrale formée par les 2 anneaux β , qui renferme les sites actifs responsables de l'hydrolyse des liaisons peptidiques du substrat (**figure I 19A**). En effet, des études génétiques (Heinemeyer et al, 1991; Heinemeyer et al, 1993) puis biochimiques (Zwickl et al, 1994) avaient déjà fourni les premières preuves que les sous-unités β sont porteuses de l'activité catalytique, avant que le protéasome de *T. acidophilum* ne soit caractérisé comme une hydrolase à nucléophile N-terminal (Ntn hydrolase), avec la thréonine N-terminale de la sous-unité β servant de nucléophile actif (Lowe et al, 1995; Seemuller et al, 1995). Chez les archéobactéries, les 2x7 sous-unités β fournissent ainsi 14 sites catalytiques identiques le long de la chambre protéolytique. Au contraire, les protéasomes 20S eucaryotes ne contiennent que 3 sous-unités β catalytiques, $\beta 1$, $\beta 2$ et $\beta 5$, soit 6 sites actifs (Chen & Hochstrasser, 1996; Groll et al, 1997; Heinemeyer et al, 1997). Les 4 autres β , tout comme les sous-unités α , sont catalytiquement inactives. $\beta 1$, $\beta 2$ et $\beta 5$ utilisent le groupement hydroxyl de leur résidu thréonine N-terminal comme nucléophile pour trois activités catalytiques distinctes, l'activité de type caspase ($\beta 1$, clivage après des résidus acides), l'activité de type trypsine ($\beta 2$, clivage après des résidus basiques), et l'activité de type chymotrypsine ($\beta 5$, clivage après des résidus hydrophobes) (Kisselev et al, 2006). $\beta 5$ a également la capacité de cliver après les petits acides aminés neutres (SNAAP, Small Neutral Amino Acid Preferring activity) et ceux à chaîne latérale branchée (BrAAP, Branched Chain Amino Acid Preferring activity). De même, $\beta 1$ possède une activité BrAAP limitée (Nussbaum et al, 1998). Les activités protéolytiques conjuguées du 20S eucaryote, combinées à la concentration physique des 6 sites actifs au sein de la chambre catalytique, lui assurent une grande efficacité de protéolyse. La dégradation par le protéasome fonctionne de manière récurrente, « processive » ; chez la levure *S. cerevisiae*, la taille moyenne des produits de clivage par le protéasome est de 3 à 25 résidus (Nussbaum et al, 1998), qui sont ensuite hydrolysés par des peptidases en acides aminés réutilisés pour la biosynthèse des protéines (voir paragraphe 3.6.7). Les sous-unités β catalytiques⁷ sont synthétisées sous la forme de précurseurs inactifs contenant un propeptide N-terminal clivé par autolyse au cours de l'assemblage du protéasome, « libérant » ainsi la thréonine N-terminale (**figure I 20B**) (voir paragraphe 3.5.1.3).

3.2.3 Accès à la chambre catalytique du protéasome 20S eucaryote

Les substrats pénètrent à l'intérieur du protéasome 20S eucaryote grâce à un pore étroit situé au centre de chaque anneau α périphérique. A l'état basal, ces pores sont obstrués par une barrière, une « porte » formée de l'enchevêtrement des queues N-terminales des sous-unités α (Groll et al, 1997; Groll et al, 2000) (**figure I 19B**). L'activité protéolytique du 20S est donc latente. Des protéasomes 20S libres purifiés sont ainsi incapables (ou presque) de dégrader ne serait-ce que de petits peptides. Un rôle majeur du 19S est d'ouvrir cette porte pour permettre l'entrée du substrat – en d'autres termes, d'activer le 20S (voir paragraphe 3.6.2). Cependant, même ouverts – le diamètre maximal du pore est de 20Å (Pickart & Cohen, 2004) – les pores sont trop étroits pour permettre à des polypeptides repliés d'entrer, ce qui a pour conséquence

⁷ Les sous-unités $\beta 6$ et $\beta 7$ non-catalytiques sont également synthétisées avec un propeptide N-terminal (Heinemeyer et al, 2004).

(i) de protéger les protéines cellulaires natives d'une destruction incontrôlée et (ii) de nécessiter, en plus d'un système d'ouverture du pore, un mécanisme de dépliement des protéines avant leur translocation dans le 20S, également assuré par le 19S (voir paragraphes 3.6.4 et 3.6.5). Notons que le 20S peut également être activé (entre autres) par des complexes régulateurs ne possédant pas de capacité de dépliement des protéines (PA28 et PA200, voir paragraphe 3.4) ou par des traitements chimiques (voir paragraphe 3.6.2.2.4). Les protéasomes 20S ainsi activés sont doués d'une activité peptidase (que l'on peut mesurer *in vitro* avec, par exemple, des peptides fluorogéniques) mais sont par contre dépourvus d'activité protéase – il sont incapables de dégrader des protéines repliées (à quelques exceptions près).

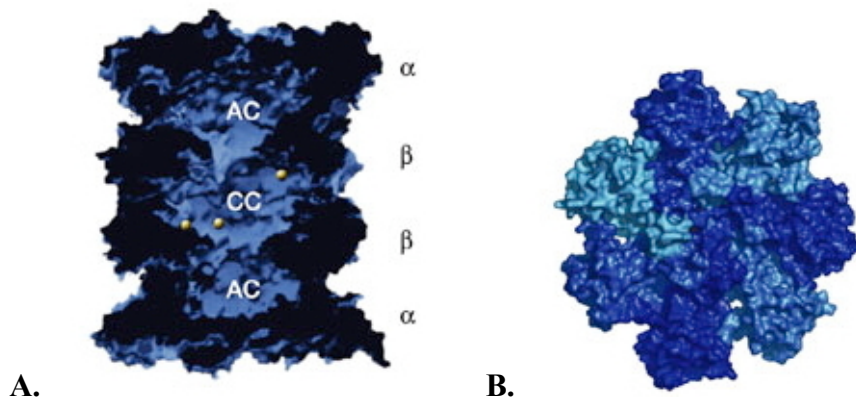


Figure I 19. Coupe longitudinale et vue du dessus du protéasome 20S de *S. cerevisiae*. Extrait de (Pickart & Cohen, 2004)

A. Coupe longitudinale du 20S. Les trois cavités continues du 20S S sont visibles : 2 cavités distales (les « antichambres », AC) entourent la chambre catalytique (CC) centrale renfermant les sites actifs portés par les sous unités $\beta 1$, $\beta 2$ et $\beta 5$ (sphères jaunes).

B. Vue du dessus du 20S. A l'état basal, le pore axial du 20S conduisant à la chambre catalytique est fermé par les queues N-terminales des sous-unités α .

L'architecture du protéasome 20S eucaryote répond idéalement aux exigences du système ubiquitine-dépendant de dégradation sélective et irréversible des protéines. La compartimentation des activités catalytiques du 20S au sein d'une chambre protéolytique dont l'accès est contrôlé a le double avantage de fournir un espace clos de digestion au sein duquel plusieurs activités protéasiques sont concentrées pour assurer une dégradation complète et rapide du substrat (et donc éviter, contrairement aux protéases conventionnelles, la production de fragments conservant une activité biologique) tout en préservant les autres protéines de la cellule d'une dégradation inopportune.

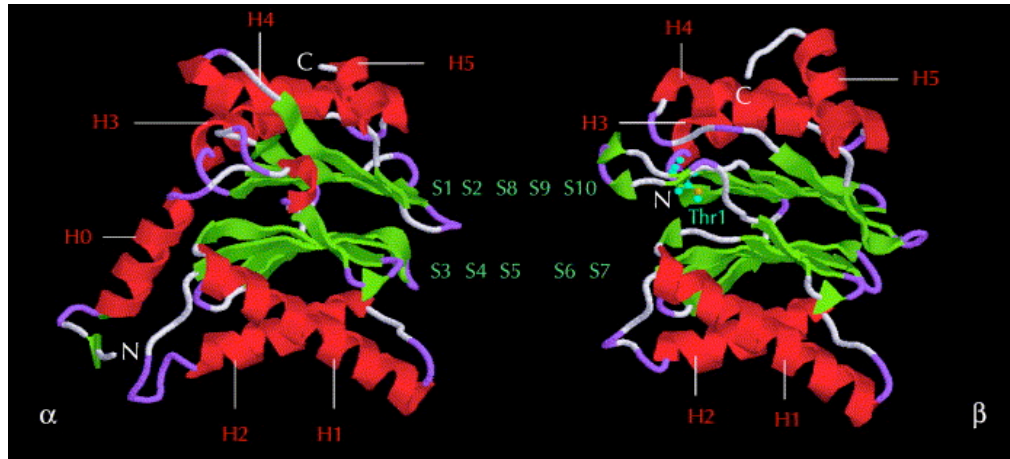
Outre les archéobactéries, le protéasome 20S est présent chez certaines eubactéries comme *Rhodococcus erythropolis*. Les eubactéries possèdent également des complexes protéases très proches du protéasome 20S. Autant d'exemples de protéases autocompartimentées (Groll et al, 2005).

3.2.4 Antichambres du protéasome 20S

Les sous-unités α permettent l'association du 20S avec les complexes régulateurs et contrôlent le passage des substrats et des produits de dégradation vers l'intérieur ou l'extérieur du protéasome (voir paragraphe 3.6.2). De plus, ils forment avec les anneaux β

deux cavités distales (des « antichambres ») conduisant à la chambre catalytique centrale (Lowe et al, 1995; Groll et al, 1997) (**figure I 19A**). La taille de ces 2 antichambres ($\approx 59\text{nm}^3$, contre $\approx 84\text{nm}^3$ pour la chambre catalytique) indique qu'elles peuvent contenir une quantité considérable de protéines ou de produits de dégradation. 2 hypothèses prédominent quant à leur rôle : par analogie au pré-estomac des ruminants, elles pourraient servir de lieu de stockage des substrats dépliés avant leur dégradation, et/ou permettraient aux oligopeptides de pénétrer à nouveau dans la chambre catalytique pour y être dégradés plus avant (Pickart & Cohen, 2004). La première hypothèse a été confirmée récemment (Sharon et al, 2006b).

A.



B.

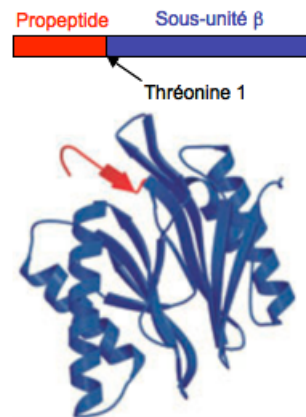


Figure I 20. Structure des sous-unités α et β de *T. acidophilum*

A. Les deux sous-unités présentent un repliement commun caractérisé par 2x5 feuillets β (en vert) entourés de part et d'autre par 2 hélices α H1-H2 et H3-H4 (en rouge). Extrait de (Wolf & Hilt, 2004).

B. L'hélice H0, localisée dans la partie N-terminale de la sous-unité α est remplacée par un propeptide dans la sous-unité β , qui est clivé au cours de l'assemblage pour révéler la thréonine N-terminale servant de nucléophile. Adapté de (Groll et al, 2005).

3.2.5 Structure des sous-unités du protéasome 20S

Les sous-unités α et β du protéasome de *T. acidophilum* contiennent, malgré des séquences primaires très différentes, un repliement commun caractérisé par un « sandwich » de 2x5 feuillets β (S1 à S10) entourés de part et d'autre de 2 hélices α , H1-H2 et H3-H4 (Lowe et al, 1995). H1 et H2 permettent l'association entre les anneaux α et β , H3 et H4 médient

l'interaction entre les 2 anneaux β . Une cinquième hélice, H0, localisée dans la partie N-terminale de la sous-unité α est remplacée par un propeptide dans la sous-unité β , qui est clivé au cours de l'assemblage pour révéler le site catalytique (**figure I 20**).

Ce repliement caractéristique est conservé dans les sous-unités du protéasome eucaryote, qui contiennent en plus chacune des structures additionnelles (boucles internes, extensions C-terminales et N-terminales) correspondant à des sites de contact bien définis entre les différentes sous-unités à l'intérieur des anneaux (contacts en *cis*) et entre les anneaux (contacts α -*trans*- β et β -*trans*- β) conduisant à leur incorporation à une position spécifique au sein du 20S (Groll et al, 1997; Unno et al, 2002).

3.2.6 Sous-unités alternatives du protéasome 20S

Chez la levure *S. cerevisiae*, les sous-unités du protéasome 20S sont codés par 14 gènes, tous essentiels à l'exception de *PRE9/ α 3* (Emori et al, 1991), ce qui reflète l'importance physiologique du protéasome. Chez les mammifères, au moins 3 gènes additionnels existent, dont l'expression est induite par l'interféron γ qui stimule la réponse immunitaire. Ils codent 3 variants des sous-unités β catalytiques constitutives, qui leur sont très proches : β 1i/LMP2 (i, induced), β 2i/MECL-1 et β 5i/LMP7 (Baumeister et al, 1998). L'incorporation de ces sous-unités en lieu et place de β 1, β 2 et β 5 au cours de l'assemblage résulte en la formation d'un immunoprotéasome qui semble mieux « adapté » à la génération de peptides antigéniques pouvant s'associer aux molécules du CMHI (Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe I) (Goldberg et al, 2002) (voir paragraphe 3.6.7.2). L'identification d'isoformes des sous-unités α et β chez les plantes et la drosophile suggère que d'autres types de protéasomes « spécialisés » existent chez ces organismes (Fu et al, 1998a; Ma et al, 2002).

Le **tableau I 3** récapitule l'ensemble des noms utilisés pour désigner les sous-unités du protéasome 20S chez les eucaryotes.

3.3 Complexe régulateur 19S

Le 19S est un complexe macromoléculaire de 900kDa qui s'associe au protéasome 20S pour former le protéasome 26S responsable de la dégradation ATP-dépendante des protéines marquées d'une chaîne de polyubiquitine K48. Le 19S assure tout à la fois la reconnaissance des substrats polyubiquitylés, leur dépliement puis leur translocation dans le 20S où leur destin sera scellé. Un complexe aux multiples talents, qui contient également une activité déubiquitinase permettant le recyclage des molécules d'ubiquitine signalant la dégradation.

Le 19S peut se lier à une seule (configuration RP-CP de 1,5MDa) ou aux 2 extrémités du 20S (configuration RP₂-CP de 2,4MDa) (Glickman et al, 1998b). On parle parfois de protéasome 30S pour distinguer les protéasomes 20S associés à 2 particules régulatrices.

La composition du 19S est remarquablement similaire depuis les levures jusqu'aux mammifères (Glickman & Ciechanover, 2002). Compte tenu de la diversité des études réalisées sur la RP, qui plus est dans différents organismes, plusieurs nomenclatures unifiées des sous-unités ont vu le jour. Nous utiliserons essentiellement la nomenclature levure au cours de cette introduction (Finley et al, 1998). Le **tableau I 3** récapitule l'ensemble des noms utilisés pour désigner les sous-unités de la RP.

PROTEASOME 20S

Baumeister. <i>et al.</i> ¹	'Old' human	Coux <i>et al.</i> ²	Groll <i>et al.</i> ⁴	Miscellaneous
20S α-type subunits				
$\alpha 1$	iota	Pro- $\alpha 6$	$\alpha 1_{sc}$	Pros27, p27k, C7, Prs2, Y8, Prc2, Scl1
$\alpha 2$	C3	Pro- $\alpha 2$	$\alpha 2_{sc}$	Pre8, Prs4, Y7
$\alpha 3$	C9	Pro- $\alpha 4$	$\alpha 3_{sc}$	Pre9, Prs5, Y13
$\alpha 4$	C6-S	Pro- $\alpha 3$	$\alpha 4_{sc}$	XAPC-7, Pre6
$\alpha 5$	zeta	Pro- $\alpha 1$	$\alpha 5_{sc}$	Pup2, Doa5
$\alpha 6$	C2	Pro- $\alpha 5$	$\alpha 6_{sc}$	nu, Pros30, p30k, Pre5
$\alpha 7$	C8	Pro- $\alpha 7$	$\alpha 7_{sc}$	Pre10, Prs1, C1, Prc1
	C6-L			
20S β-type subunits				
$\beta 1$	Y	Pro- $\beta 3$	$\beta 1_{sc}$	delta, Lmp9, Pre3
$\beta 1i$	Lmp2	Pro- $\beta 3$		Ring12
$\beta 2$	Z	Pro- $\beta 2$	$\beta 2_{sc}$	Lmp19, MC14, Pup1
$\beta 2i$	MECL-1	Pro- $\beta 2$		Lmp10
$\beta 3$	C10	Pro- $\beta 6$	$\beta 3_{sc}$	theta, Pup3
$\beta 4$	C7	Pro- $\beta 4$	$\beta 4_{sc}$	Pre1, C11
$\beta 5$	X	Pro- $\beta 1$	$\beta 5_{sc}$	epsilon, Lmp17, MB1, Pre2, Doa3, Prg1
$\beta 5i$	Lmp7	Pro- $\beta 1$		Ring10, Y2, C13
$\beta 6$	C5	Pro- $\beta 5$	$\beta 6_{sc}$	gamma, Pre7, Prs3, C5, Pts1
$\beta 7$	N3	Pro- $\beta 7$	$\beta 7_{sc}$	beta, Pros26, Pre4

COMPLEXE REGULATEUR 19S

Finley, <i>et al.</i> ⁵	Dubiel <i>et al.</i> ³	Miscellaneous	
19S (PA700) regulator ATPase subunits			
Rpt1	S7	p48	Mss1, Yta3, Cim5
Rpt2	S4	p56	Yhs4, Yta5, Mts2
Rpt3	S6b	p48	Tbp7, Yta2, Ynt1, MS73
Rpt4	S10b	p42	Sug2, Pcs1, Crl13, CADp44
Rpt5	S6a	p50	Tbp1, Yta1
Rpt6	S8	p45	Trip1, Sug1, Cim3, Crl3, Tby1, Tbp10,
19S (PA700) regulator non-ATPase subunits			
Rpn1	S2	p97	Trap2, Nas1, Hrd2, Rpd1, Mts4
Rpn2	S1	p112	Sen3
Rpn3	S3	p58	Sun2
Rpn4			Son1, Ufd5
Rpn5		p55	Nas5
Rpn6	S9	p44.5	Nas4/6?
Rpn7	S10a	p44	HUMORF07
Rpn8	S12	p40	Mov-34, Nas3
Rpn9	S11	p40.5	Les1, Nas7
Rpn10	S5a	p54	ASF1, Sun1, Mcb1, Mbp1
Rpn11	S13		Poh1, Mpr1, Pad1
Rpn12	S14	p31	Nin1, Mts3
	S5b	p50.5	

Tableau I 3. Nomenclatures des sous-unités du protéasome 26S eucaryote (BIOMOL International LP, 2005)

Rpn13 et Rpn15/Sem1 ne figurent pas dans ce tableau. ¹(Baumeister et al, 1998), ²(Coux et al, 1994), ³(Dubiel et al, 1995), ⁴(Groll et al, 1997), ⁵(Finley et al, 1998).

3.3.1 Composition du complexe régulateur 19S

Le 19S se compose de 2 modules structuraux distincts, la base et le couvercle, reliés par la protéine Rpn10/S5a (Glickman et al, 1998a) (**figures I 21 et I 22**). La base est composée de 6 sous-unités ATPasiques à domaine AAA⁺ (ATPases Associated with various cellular Activities), Rpt1 à Rpt6 (Regulatory Particle Triple A protein), associées à 2 sous-unités non-ATPasiques, Rpn1 et Rpn2 (Regulatory Particle Non-ATPase) (Glickman & Ciechanover, 2002). Le couvercle contient 9 sous-unités (Rpn3, Rpn5 à 9, Rpn11, Rpn12 et la « petite dernière », Sem1/Rpn15) (Glickman & Ciechanover, 2002; Funakoshi et al, 2004; Krogan et al, 2004; Sone et al, 2004). Découverte plus récemment, la protéine Rpn13 est considérée comme une sous-unité intrinsèque du 19S (Verma et al, 2000; Qiu et al, 2006).

La séparation du 19S en base et en couvercle est basée sur les travaux de Glickman *et al.* qui ont montré que la RP préparée à partir de mutants *rpn10Δ* se dissocie en 2 sous-complexes au cours de la purification du protéasome, complexes dont ils ont déterminé la composition. Des observations de microscopie électronique ont valu à la partie proximale qui reste associée au protéasome 20S dans un mutant *rpn10Δ* le nom de base, à la partie distale qui peut être « décrochée » du protéasome en absence de Rpn10 celui de couvercle (Glickman et al, 1998a) (**figure I 22**). Rpn10 se trouve en fait à l'interface entre les 2 composants de la RP, dont elle stabilise les interactions. Rpn10 est étroitement associée à la base mais peut aussi se lier au couvercle (Glickman et al, 1998a; Saeki et al, 2000; Fu et al, 2001) et, cas unique parmi les sous-unités du protéasome, elle est également retrouvée sous forme libre (van Nocker et al, 1996).

La quasi-totalité des gènes codant des sous-unités de la RP sont essentiels chez la levure, à l'exception de *RPN9* (au moins dans certains fonds génétiques), *RPN10*, *RPN13* et *SEM1/RPN15*.

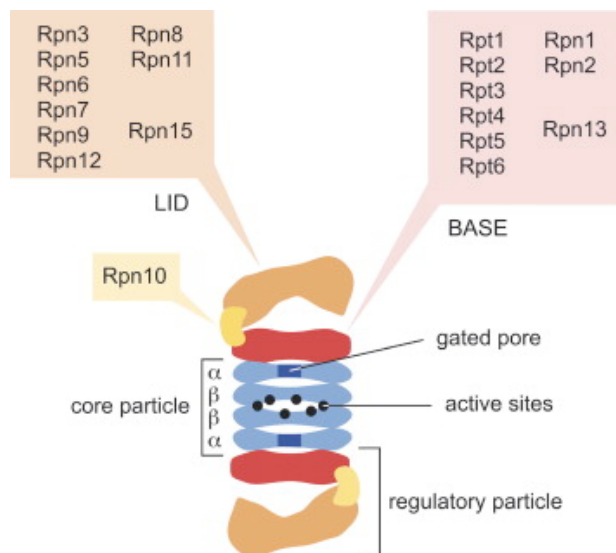


Figure I 21. Représentation schématique du protéasome 26S. Extrait de (Hanna & Finley, 2007)

La structure du 19S n'ayant toujours pas été résolue, l'organisation précise des sous-unités du 19S n'est pas connue. L'architecture présentée ici est basée sur des observations de microscopie électronique. L'appartenance de Rpn13 à la base n'a pour l'heure pas été démontrée.

Parmi les 19 sous-unités de la RP identifiées, toutes sont retrouvées chez tous les eucaryotes à l'exception notable de S5b, une sous-unité putative de la base qui semble présente uniquement chez l'Homme (Deveraux et al, 1995a) (Gorbea et al, 2000). Nous espérons avoir résolu ce dilemme au laboratoire. Ces 19 sous-unités constituent le cœur du 19S, mais plusieurs protéines additionnelles peuvent s'associer, au moins transitoirement, avec la RP

(Ferrell et al, 2000; Verma et al, 2000; Leggett et al, 2002; Guerrero et al, 2006) (voir ci-dessous).

Les sous-unités de la base assurent l'accrochage aux anneaux α du protéasome et l'ouverture du 20S, et sont nécessaires au dépliement des substrats ainsi qu'à leur translocation dans le 20S. Le couvercle est requis pour la dégradation des protéines ubiquitinylées, essentiellement – uniquement ? – en assurant le couplage entre la déubiquitylation des substrats et leur dégradation. L'ensemble de ces processus sont détaillés dans la partie 3.6 « Mécanistique de la dégradation des substrats du protéasome ».

3.3.2 Conservation des sous-unités du 19S chez les eucaryotes

Comme pour le protéasome 20S ou l'ubiquitine, la conservation des sous-unités de la RP est assez exceptionnelle. Les 6 Rpt sont les sous-unités de la RP les mieux conservées, avec de 66 à 76% d'identité entre les protéines mammifères et levures. Les identités de séquence entre homologues des sous-unités non-ATPasiques de la RP sont légèrement moindres, de l'ordre de 40% (à l'exception de Rpn11) (Glickman et al, 1998b; Glickman & Ciechanover, 2002). Les six ATPases présentent un degré important d'identité entre elles (environ 40%), le domaine ATPase triple A étant encore mieux conservé (Rubin et al, 1998). Cependant, les 6 Rpt ne sont ni redondantes ni interchangeables et présentent des fonctions spécifiques : des mutations similaires au sein du domaine ATPase de chaque sous-unité provoquent des phénotypes différents (Rubin et al, 1998; Kohler et al, 2001). De plus, comme d'autres laboratoires, nous avons observé chez *S. cerevisiae* que la surexpression d'une Rpt donnée ne permet pas de compenser l'absence d'une autre Rpt ((Ferrell et al, 2000) et données non publiées).

Rpn1 et Rpn2 présentent près de 20% d'identité, possèdent des répétitions PC (Proteasome-Cyclosome) (Lupas et al, 1997), une architecture et une taille similaires ; on pense qu'elles ont évolué à partir d'un ancêtre commun (Glickman & Ciechanover, 2002; Kajava, 2002).

Toutes les sous-unités du couvercle (à l'exception de Sem1/Rpn15) contiennent l'un des 2 motifs structuraux suivants : le domaine PCI (Proteasome/COP9/eucaryotic Initiation Factor) (Rpn3/5/6/7/9/12) ou le domaine MPN (Mpr1, Pad1 N-terminal) (Rpn8 et Rpn11). Ces domaines sont retrouvés au sein des membres de 2 autres macrostructures eucaryotes, le COP9/Signalosome (CSN, impliqué dans la transduction du signal) et le facteur d'initiation de la traduction eIF3 (eucaryotic Initiation Factor 3). La composition du couvercle et du CSN sont étonnamment similaires (6 sous-unités contiennent un motif PCI et 2 un motif MPN), et il a été proposé que ces 2 complexes proviennent d'un même ancêtre commun (Glickman et al, 1998a; Hofmann & Bucher, 1998; Henke et al, 1999; Fu et al, 2001). Bien que leurs fonctions ne soient pas élucidées, les motifs PCI sont importants pour les interactions entre les sous-unités de ces complexes (Fu et al, 2001; Scheel & Hofmann, 2005). La sous-unité Rpn11 est la mieux conservée des composants du couvercle, la seule capable de rivaliser avec les Rpt avec ses 65% d'identité entre les protéines humaine et levure ! Ce qui n'est guère surprenant : Rpn11 est l'unique sous-unité du couvercle à activité catalytique, une métalloprotéase à Zn^{2+} responsable de la déubiquitylation des substrats avant leur dégradation (Verma et al, 2002; Yao & Cohen, 2002). Sem1/Rpn15 est l'homologue de la protéine DSS1 (Deleted-in-Split-Hand/Split-Foot-1) chez les eucaryotes supérieurs. DSS1 interagit avec le produit du gène de susceptibilité au cancer du sein BRCA2 (Marston et al, 1999), et semble participer à la réparation de l'ADN par recombinaison homologue (Yang et al, 2002; Kojic et al, 2003).

3.3.3 Similitudes et différences du 19S et des complexes régulateurs procaryotes

L'activation des protéasomes 20S eucaryotes et archébactériens, ainsi que de leurs alter-egos eubactériens, requiert leur association avec des complexes régulateurs composés entièrement (dans les cas des eubactéries et des archébactéries) ou partiellement (pour les eucaryotes) d'ATPases de la famille triple A (Ogura & Wilkinson, 2001)⁸ (**figure I 22**). Les complexes régulateurs bactériens sont des anneaux ATPasiques homo-hexamériques dont les ouvertures sont juxtaposées aux pores axiaux des complexes catalytiques (Pickart & Cohen, 2004). Chez les archébactéries, le complexe régulateur PAN de *Methanococcus jannaschii* active la protéolyse par le protéasome 20S archébactérien *in vitro* (Zwickl et al, 1999). Il est composé de 6 sous-unités ATPases identiques qui sont de proches homologues des Rpt eucaryotes (Zwickl et al, 1999). Les 2 sous-unités non-ATPasiques de la base (Rpn1 et Rpn2), Rpn10, Rpn13 ainsi que la totalité des sous-unités du couvercle de la RP eucaryote ne sont par contre retrouvées ni chez les eubactéries ni chez les archébactéries (Pickart & Cohen, 2004). Et bien que la base de la RP eucaryote soit capable d'activer le 20S pour la dégradation de peptides ou d'une protéine non-ubiquitinylée, le couvercle est indispensable à la protéolyse des substrats polyubiquitinylés (Glickman et al, 1998a). Une explication finaliste verrait ainsi dans l'apparition concomitante du couvercle (et des sous-unités Rpn1/2/13/10) et de l'ubiquitine chez les eucaryotes la complexification d'un système de protéolyse préexistant lui conférant un niveau supplémentaire de régulation.

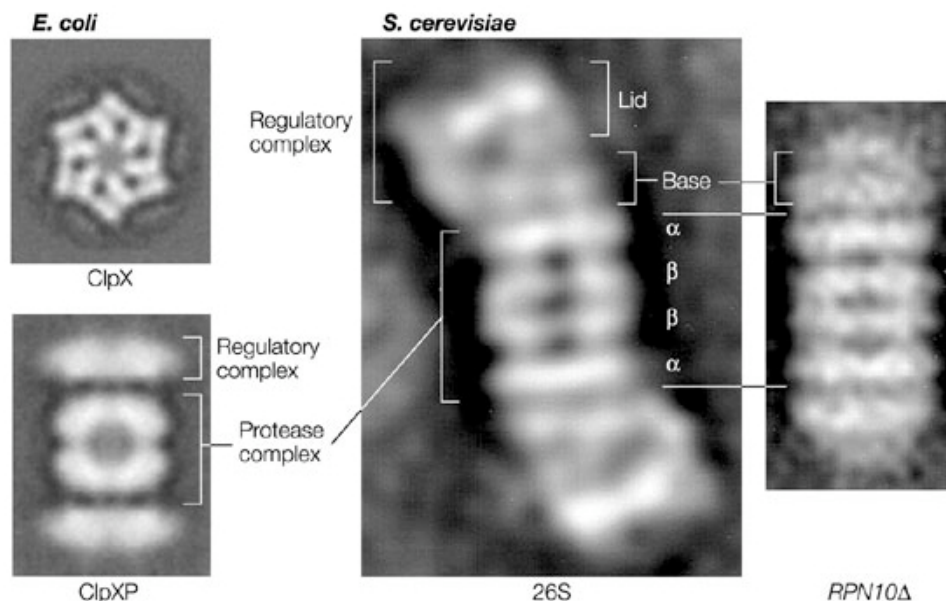


Figure I 22. Images de microscopie électronique de protéases compartimentées. Extrait de (Pickart & Cohen, 2004)

Analogie entre les complexes ATPases bactériens et les sous-unités ATPases de la base du 19S eucaryote. A gauche, exemple du complexe régulateur ClpX qui s'associe au complexe protéase ClpP pour former l'holoenzyme ClpXP chez *E. coli*. ClpX, vue du dessus. ClpXP, vue transversale. Au centre, protéasome 26S de *S. cerevisiae* ; vue transversale. Chez la levure, l'absence de Rpn10 fragilise l'association base/couvercle ; un complexe formé du 20S associé à la base peut ainsi être isolé dans un mutant *rpn10Δ* (Glickman et al, 1998a).

⁸ Des complexes régulateurs dépourvus d'ATPases existent également chez les eucaryotes, voir paragraphe 3.4.

De même que les 14 sous-unités α et β du CP eucaryote ont probablement divergé de précurseurs α et β uniques retrouvés chez les archées (Volker & Lupas, 2002), il est envisageable que les six ATPases eucaryotes proviennent d'un même ancêtre, tel que la sous-unité PAN de l'archéobactérie *M. jannaschii* (Zwickl et al, 1999). L'homologie du couvercle de la RP avec le COP9/Signalosome, suggérant une origine commune, sépare un peu plus la base du couvercle et renforce la vision « modulaire » de la RP avec l'acquisition au cours de l'évolution de la fonction de dégradation des protéines polyubiquitinylées.

3.3.4 Organisation du complexe régulateur 19S

3.3.4.1 Données de microscopie électronique

Contrairement au protéasome 20S, la structure à haute résolution du 19S nous échappe toujours, du fait d'une mauvaise cristallisation du complexe. Des analyses par microscopie électronique ont dévoilé une structure asymétrique en forme de « tête de dragon chinois », chacune pointant dans une direction opposée au sein des protéasomes 26S dont les 2 extrémités sont associées à une RP (Peters et al, 1993; Walz et al, 1998). La partie proximale liée au CP correspond à la base, qui interagit également avec la partie distale de la RP, le couvercle (Glickman et al, 1998a) (**figure I 22**).

L'image tridimensionnelle à basse résolution du 26S reconstituée à partir des observations en microscopie électronique a révélé une certaine flexibilité dans l'interaction RP/CP, en particulier un mouvement de rotation de la RP par rapport au CP, dont la pertinence physiologique reste à déterminer (Walz et al, 1998) (voir paragraphe 3.6.2.2.2). Par contre, les caractéristiques structurales de la base et du couvercle y sont difficilement discernables.

3.3.4.2 A la recherche de l'organisation du 19S

A défaut de structure, d'autres approches ont permis de préciser à la fois l'organisation de la RP et son interaction avec le 20S. L'utilisation du système double-hybride (DH) chez la levure a été d'une aide précieuse pour déterminer les interactions entre les différentes sous-unités du protéasome et notamment de la RP (Cagney et al, 2001; Davy et al, 2001; Fu et al, 2001; Chen et al, 2008). Une vingtaine d'interactions protéine-protéine a été mise en évidence pour les sous-unités du 26S de *Caenorhabditis elegans*, environ 40 pour *S. cerevisiae* et presque 150 pour le protéasome humain ! Une carte des interactions protéiques au sein du 26S de plus en plus complète permettant d'affiner les modèles structuraux... De nombreuses interactions obtenues par double-hybride sont retrouvées indépendamment par différents laboratoires, démontrant la fiabilité de ces données. De plus, confrontées aux informations structurales disponibles pour le 20S, une grande partie des interactions intra-CP détectées par double-hybride apparaissent tout à fait cohérentes (Chen et al, 2008). Quant aux autres, à celles qui ne sont pas prédites par le modèle cristallographique du 20S, elles ne découlent pas nécessairement de biais liés à la technique du double-hybride (repliement aberrant des protéines de fusion, faux-positifs, « triple-hybride » faisant intervenir une troisième protéine...) mais pourraient correspondre, entre autres, à des intermédiaires d'assemblage (Chen et al, 2008).

Les données double-hybride disponibles pour la RP sont, en absence de structure disponible, une des sources principales d'information sur son organisation. Elles ne sont néanmoins pas les seules. L'analyse des complexes RP isolés à partir de cellules exprimant des formes mutantes de sous-unités spécifiques du couvercle (par exemple (Isono et al, 2004; Isono et al,

2005; Isono et al, 2007)), la détection d'interactions *in vitro* entre des protéines de la RP (Gorbea et al, 2000), l'utilisation de méthodes de pontage chimique qui permettent la détection d'interactions directes (Hartmann-Petersen et al, 2001; Sharon et al, 2006a) et les données issues de cribles d'interaction à haut débit (Uetz et al, 2000; Ito et al, 2001; Gavin et al, 2002; Ho et al, 2002; Krogan et al, 2006) ont fourni de précieuses informations. L'exploration du protéasome par des approches protéomiques (utilisation extensive de la spectrométrie de masse...) est tout aussi fructueuse et a déjà permis d'identifier des modifications post-traductionnelles de plusieurs sous-unités (pour une revue, (Drews et al, 2007)). De telles approches sont particulièrement adaptées à l'étude qualitative et quantitative des complexes dynamiques et hétérogènes que sont les protéasomes.

3.3.4.2.1 Organisation de la base

On présume que les 6 Rpt de la base forment une structure en anneau par analogie avec les complexes ATPases hexamériques des protéases compartimentées bactériennes et grâce aux observations de microscopie électronique (Glickman et al, 1998a; Ogura & Wilkinson, 2001; Smith et al, 2006) (**figure I 22**). Les interactions connues entre les Rpt suggèrent que l'anneau hexamérique putatif est orienté comme suit : Rpt1-Rpt3-Rpt5-Rpt4-Rpt6-Rpt2 (Glickman & Ciechanover, 2002). Récemment, une méthode de photopontage permettant de détecter des interactions spécifiques *in vivo* a montré que Rpt1 et Rpt4 n'interagissent pas directement, un résultat cohérent avec ce modèle (Suchanek et al, 2005). Rpn1 contacte les sous-unités ATPasiques Rpt1, Rpt2, Rpt6 ainsi que Rpn2, qui interagit avec Rpt4, Rpt6 et Rpn13⁹ (Fu et al, 2001; Hartmann-Petersen et al, 2001; Ito et al, 2001; Hamazaki et al, 2006; Chen et al, 2008). Il a été proposé que Rpn1 et Rpn2 s'associent sur les flancs opposés de l'anneau de Rpt (Smith et al, 2006), mais des données récentes suggèrent que Rpn2 contacte directement l'anneau α , et que Rpn1 se situe au-dessus de Rpn2 (Rosenzweig et al, 2008). Ces données reprennent le modèle structural proposé par Kajava où Rpn1 et Rpn2 forment deux toroïdes (ou anneaux) empilés l'un sur l'autre et insérés à l'intérieur de l'anneau hexamérique des Rpt (Kajava, 2002). La **figure I 23** essaie de récapituler l'ensemble de ces informations.

De façon intéressante, un sous-groupe (ou cluster) Rpt4-Rpt5-Rpt3-Rpt6 a été identifié par DH chez la levure (Fu et al, 2001), alors qu'un tétramère « complémentaire » Rpt1-Rpt2-Rpn1-S5B peut se former *in vitro* (Gorbea et al, 2000), suggérant l'existence de sous-complexes au sein de la base qui pourraient correspondre à des intermédiaires d'assemblage (voir paragraphe 3.5.2.1). Un tétramère Rpt1-Rpt2-Rpt3-Rpt6 a également été décrit *in vitro* (Richmond et al, 1997).

3.3.4.2.2 Organisation du couvercle

Les interactions intra-couvercle ont été étudiées quasi-exclusivement par des approches double-hybride (Cagney et al, 2001; Fu et al, 2001; Isono et al, 2004; Isono et al, 2005; Isono et al, 2007; Chen et al, 2008). Un groupe composé des sous-unités Rpn5-Rpn6-Rpn8-Rpn9-Rpn11 semble former le cœur du couvercle. Récemment, Sharon et al. ont réalisé des expériences de pontage chimique couplées à la spectrométrie de masse pour analyser le couvercle (Sharon et al, 2006a). Grâce à cette approche, ils ont (ré)-identifié un sous-complexe hétérotétramérique formé des sous-unités Rpn5, Rpn6, Rpn8 et Rpn9 au sein duquel Rpn8 occupe une position centrale ; Rpn11 interagit avec Rpn5, Rpn8 et Rpn9. Ils ont

⁹ Nous positionnons Rpn13 au sein de la base uniquement par souci de cohérence avec la **figure I 21**.

pu démontrer que Rpn6, Rpn9 et Rpn12 se trouvent à la périphérie du couvercle, que Rpn5 se lie à Rpn3 et que Sem1 interagit avec Rpn7 et Rpn3. En croisant ces informations avec les données génétiques, biochimiques et double-hybride disponibles, ils ont proposé un modèle détaillé d'organisation du couvercle représenté sur la **figure I 24**. Ce n'est pas encore de la structure, mais ça y ressemble de plus en plus...

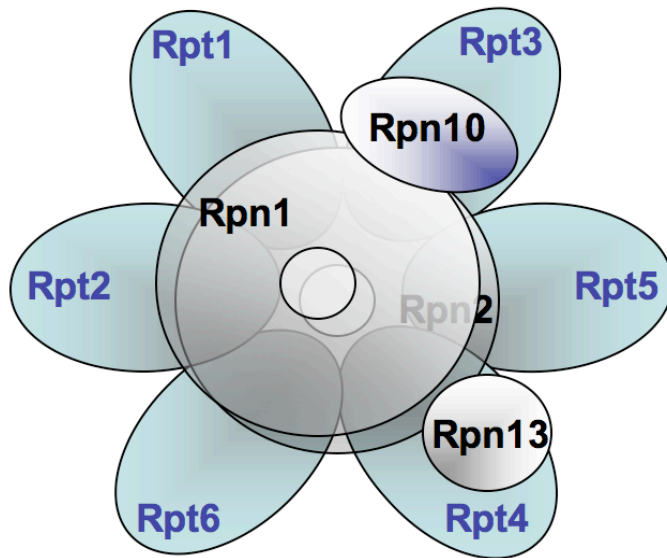


Figure I 23. Organisation supposée de la base du 19S

Les 6 sous-unités ATPases de la base forment un hexamère putatif Rpt1-Rpt3-Rpt5-Rpt4-Rpt6-Rpt2. Rpn1 contacte Rpt1, Rpt2 et Rpt6, ainsi que Rpn2 qui interagit avec Rpt4, Rpt5 et Rpn13. Rpn10, située à l'interface entre la base et le couvercle, interagit en double-hybride avec Rpn1 et Rpt3. Rpn1 et Rpn2 forment deux toroïdes empilés l'un sur l'autre (avec Rpn1 sur le dessus) qui s'insèrent dans l'hexamère des ATPases. L'appartenance de Rpn13 à la base n'a pour l'heure pas été formellement démontrée.

3.3.4.2.3 Organisation du 19S

D'un côté le couvercle, de l'autre la base. Ces 2 complexes sont très certainement assemblés indépendamment l'un de l'autre (voir paragraphe 3.5.2.3), et leur association est stabilisée par Rpn10 qui, seul, n'est cependant ni essentiel ni suffisant pour cette tâche (Glickman et al, 1998a; Fu et al, 2001). Les sous-unités Rpn1 et Rpn2 apparaissent comme de bons candidats pour relier la base et le couvercle : ils interagissent physiquement avec plusieurs Rpt (voir ci-dessus) et avec 2 sous-unités du couvercle, Rpn11 pour Rpn1, Rpn12 pour Rpn2 (Fu et al, 2001). Ces 2 protéines de grande taille (environ 110 kDa) forment de multiples contacts, notamment avec plusieurs facteurs accessoires du protéasome (récepteurs des substrats polyubiquitylés, enzymes de déubiquitylation...) modulant son activité (voir ci-dessous). Les interactions DH de Rpn10 avec Rpn1 et Rpt3 d'une part, Rpn9 et Rpn12 d'autre part sont en accord avec son rôle de stabilisation de la RP (Takeuchi et al, 1999; Fu et al, 2001).

En connaissant précisément l'organisation de la base et du couvercle, et à l'aide des connexions-clé établies par Rpn1/2/10, on devrait pouvoir déduire l'organisation de la RP complète. L'analyse de nouvelles données DH disponibles pour les interactions base-couvercle du protéasome humain a montré que la RP résiste à une telle approche. Chen *et al.* ont en effet détecté 12 nouvelles paires d'interaction base/couvercle, qui ne se limitent pas à Rpn1/2/10 mais concernent également les Rpt. Rpt1 interagit par exemple avec Rpn6, 8 et 9, Rpt6 avec Rpn5, 6 et 12 (Chen et al, 2008). Il semble donc qu'un grand nombre de sous-unités de la RP – la quasi-totalité, en fait – soient impliquées dans l'interaction base/couvercle. Un modèle précis de la RP reste donc toujours à définir.

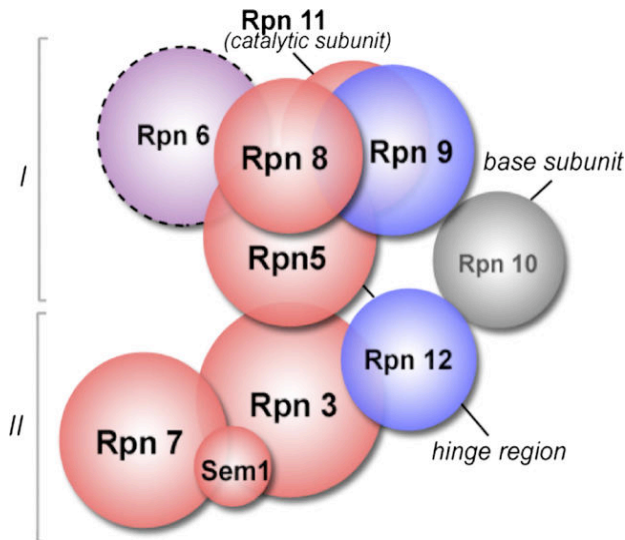


Figure I 24. Organisation supposée du couvercle du 19S. Extrait de (Sharon et al, 2006a)

On peut distinguer 2 sous-groupes, le premier (I) composé de Rpn5, Rpn6, Rpn8, Rpn9 et Rpn11, le second (II) composé de Rpn3, Rpn7, Rpn12 et Sem1/Rpn15. L'interaction Rpn5-Rpn3 semble assurer le lien entre ces 2 clusters. La sous-unité Rpn10 stabilisant l'association base/couvercle semble interagir avec Rpn9 et Rpn12. (Le code couleur utilisé n'a pas lieu d'être précisé).

3.3.4.2.4 Interactions 19S-20S

D'après les analyses par microscopie électronique du protéasome, l'association du 19S avec le 20S repose sur l'interaction entre les sous-unités de la base et l'anneau α (Glickman et al, 1998a) (**figure I 22**). Les 2 RP sont orientées dans des directions opposées au sein du 26S, ce qui reflète la symétrie C2 du 20S et suggère que les contacts entre les sous-unités du 20S et celles de la RP sont spécifiques (Peters et al, 1993; Walz et al, 1998). 9 interactions base/ α ont été rapportées dans différents organismes : α 1-Rpt5, α 1-Rpt6, α 2-Rpt6, α 2-Rpt4, α 2-Rpt5, α 4-Rpt2, α 4-Rpt4, α 6-Rpt4 et α 7-Rpt4 (Davy et al, 2001; Hartmann-Petersen et al, 2001; Satoh et al, 2001; Chen et al, 2008). Conformément à l'association dissymétrique supposée entre l'anneau hexamérique de la base et l'heptamère de sous-unités α (Walz et al, 1998), il n'est pas autrement surprenant qu'une Rpt puisse interagir avec plusieurs sous-unités α . La détection pour le protéasome humain d'interactions DH entre α 6 et les sous-unités Rpn6 et Rpn9 du couvercle ainsi que de plusieurs interactions entre des sous-unités β et des sous-unités de la RP l'est beaucoup plus (Chen et al, 2008). Très récemment, il a été proposé que Rpn2 contacte directement l'anneau α , et des expériences de cross-linking ont révélé une interaction de Rpn2 avec les sous-unités α 1, α 4, α 5, α 6 et α 7 (Rosenzweig et al, 2008).

En conclusion, même si la caractérisation de la RP et du 26S a considérablement progressé au cours de la dernière décennie, il est certain que des analyses complémentaires, en particulier de microscopie électronique et de cristallographie, seront nécessaires pour connaître la topologie précise des 19S et 26S et mieux appréhender le fonctionnement du protéasome. Identifier les sous-complexes du CP et de la RP, qui constituent autant d'intermédiaires potentiels d'assemblage, est crucial pour comprendre la formation d'une structure aussi sophistiquée que le protéasome

3.4 Autres complexes régulateurs du protéasome 20S

En plus du 19S, la plupart des cellules eucaryotes contiennent d'autres complexes régulateurs du protéasome, PA28 (aussi appelé 11S ou REG) et PA200, qui se lient spécifiquement aux anneaux α et activent le 20S pour la dégradation de peptides. Contrairement à la RP, ces régulateurs alternatifs ne reconnaissent pas les protéines polyubiquitylées et n'utilisent pas

l'ATP. Leurs rôles physiologiques sont aussi beaucoup moins bien caractérisés (Demartino & Gillette, 2007).

La famille PA28, présente chez les mammifères et certains autres métazoaires mais pas chez la levure, comporte trois gènes homologues, PA28 α , β et γ codant des protéines de 28kDa. PA γ forme un homoheptamère alors que PA28 α et β s'assemblent en un complexe hétéroheptamérique. Tout comme les sous-unités catalytiques β 1i, β 2i et β 5i de l'immunoprotéasome, PA28 α et β sont inductibles par l'interféron γ . Le complexe PA28 $\alpha\beta$ intervient dans la réponse immunitaire en contribuant à la présentation antigénique par le CMH de classe I, mais des rôles non-immunologiques sont probables. Il a été proposé que PA28 γ participe à la régulation du cycle cellulaire et de l'apoptose (Demartino & Gillette, 2007).

PA200 et son homologue levure Blm10 sont des protéines de grande taille (plus de 200kDa) se liant aux extrémités du 20S. Plusieurs rôles ont été suggérés *in vivo*, notamment dans l'activation du 20S, son assemblage ou encore dans la réparation de l'ADN, rôles pour la plupart remis en question aujourd'hui (Demartino & Gillette, 2007) (voir paragraphe 3.5.1.3.5).

En plus des activateurs, on retrouve *in vivo* des protéines inhibitrices du protéasome 26S. PI31, une protéine de 30kDa présente chez les plantes et les métazoaires, est un inhibiteur compétitif de PA28 $\alpha\beta$ pour l'activation du 20S. Pr39 se lie au protéasome et semble empêcher l'ouverture du pore axial du 20S (Demartino & Gillette, 2007).

Du fait de la présence de 2 anneaux α , un complexe 20S peut accepter 2 régulateurs différents. Toutes les combinaisons possibles n'ont pas été démontrées *in vivo*, mais des protéasomes « hybrides » 19S-20S-PA28 (générant des peptides aux propriétés antigéniques) ou 19S-20S-PA200 ont été décrits. N'oublions pas que le protéasome 20S existe également sous une forme « d'immunoprotéasome », des hybrides comportant les sous-unités immunitaires β 1i et β 2i associées à la sous-unité constitutive β 5 pouvant aussi être assemblés. Ni que de nombreuses protéines accessoires peuvent s'associer au protéasome. Vraiment, il n'y a pas *un* mais *des* protéasomes, dont les spécificités biologiques sont encore mal appréhendées. Les mécanismes de régulation gouvernant la formation et l'abondance des différents complexes restent également à découvrir. Notre étude s'est focalisée sur le protéasome 26S de la levure *S. cerevisiae*, et plus précisément sur son assemblage. Pour de plus amples informations sur la plasticité protéasomale, nous conseillons les revues (Glickman & Raveh, 2005; Rechsteiner & Hill, 2005; Demartino & Gillette, 2007).

3.5 Assemblage du protéasome 26S

L'assemblage du 20S et du 19S ont presque toujours été étudiés séparément. A notre connaissance, cependant, une seule étude a montré que ces 2 sous-complexes sont formés indépendamment l'un de l'autre (Yang et al, 1995). Un dogme qui plus est remis en cause aujourd'hui.

3.5.1 Assemblage du protéasome 20S

La biogenèse d'une structure de 28 sous-unités, depuis la production de chaque protéine jusqu'à leur incorporation à une position spécifique, est nécessairement complexe. La synthèse des sous-unités β catalytiques sous la forme de précurseurs inactifs implique en particulier une étape obligatoire de maturation. L'intégrité du protéasome 20S est ainsi

assurée par l'assemblage précis et organisé des 14 sous-unités α et des 14 sous-unités β . On a longtemps présumé que la formation spontanée de l'anneau α constitue la première étape de l'assemblage, anneau sur lequel viendraient par la suite se greffer les sous-unités β . Grâce à de nombreux et récents travaux, fort heureusement, on présume de moins en moins. L'assemblage du 20S est décrit étape par étape dans les paragraphes suivants. Un schéma global est présenté sur la **figure I 28**.

3.5.1.1 Formation de l'anneau α

3.5.1.1.1 Un auto-assemblage ?

La présomption d'un auto-assemblage des sous-unités α est née de travaux de Zwickl *et al.* qui ont montré que la sous-unité α de l'archéobactérie *T. acidophilum* exprimée chez *E. coli* s'assemble en anneaux homo-heptamériques indistinguables des anneaux terminaux retrouvés au sein du protéasome 20S (Zwickl *et al.*, 1994). Les travaux de Zwickl *et al.* ont de plus posé les bases (i) d'un auto-assemblage global du protéasome en montrant que la co-expression des sous-unités α et β du protéasome de *T. acidophilum* produit des protéasomes catalytiquement actifs et (ii) de la préséance de la formation d'un anneau α au cours de l'assemblage en révélant que l'expression de la sous-unité β seule chez *E. coli* conduit uniquement à des protéines monomériques sous forme de précurseurs (Zwickl *et al.*, 1994). Une analyse similaire a été menée par Gerards *et al.* en exprimant cette fois chez *E. coli* des sous-unités du protéasome humain (Gerards *et al.*, 1997). Comme observé pour la sous-unité α archéobactérienne, la protéine recombinante $\alpha 7$ s'auto-assemble en une structure heptamérique en anneau ; le complexe formé consiste en fait en 2 anneaux contenant chacun 7 protéines, indiquant une auto-dimérisation des anneaux $\alpha 7$. L'expression de 2 sous-unités β distinctes, $\beta 1$ ou $\beta 7$, conduit au mieux à un tétramère. Ces résultats suggèrent que les anneaux α jouent un rôle initiateur dans l'assemblage du 20S eucaryote. Cependant, contrairement à *T. acidophilum*, la co-expression d' $\alpha 7$ avec $\beta 1$ ou $\beta 7$ ne permet pas la formation d'un protéasome. Ce résultat n'est pas surprenant outre mesure compte tenu de la diversification des sous-unités α et β chez les eucaryotes et du positionnement spécifique de chacune des sous-unités au sein du 20S ; il met plutôt en lumière une certaine incongruité des anneaux $\alpha 7$ observés. Néanmoins, la sous-unité recombinante $\alpha 5$ de *Trypanosoma brucei* est elle aussi capable de s'assembler en anneaux heptamériques, plus précisément de former un cylindre composé de 4 anneaux (Yao *et al.*, 1999). L'auto-assemblage en anneau ne semble pas être une propriété intrinsèque de toutes les sous-unités α eucaryotes : les protéines recombinantes humaines $\alpha 1$ et $\alpha 6$ ne forment chacune *in vitro* que des dimères (Gerards *et al.*, 1998).

Parallèlement à ces résultats, l'identification *in vivo* de sous-complexes du protéasome composés d'un anneau α complet et de certaines sous-unités β sous forme précurseur, correspondant à des intermédiaires d'assemblage appelés hémiprotéasomes (voir ci-dessous), a indiqué que la formation du protéasome se fait de manière séquentielle, par étape, la première consistant donc très probablement à assembler l'anneau α (Frentzel *et al.*, 1994; Patel *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 1995). Néanmoins, c'est une étude récente qui a considérablement fait progresser notre compréhension des premières étapes de la biogenèse du protéasome. Hirano *et al.* ont en effet confirmé *in vivo* chez les mammifères que l'anneau α est le premier intermédiaire d'assemblage du protéasome 20S, tout en démontrant que sa

formation est assistée par un dimère de protéines, PAC1 et PAC2 (Proteasome Assembling Chaperone) (Hirano et al, 2005).

3.5.1.1.2 Les protéines chaperonnes PAC1 et PAC2

PAC1 et PAC2, 2 protéines respectivement de 288 et 264 résidus, sont ubiquitaires chez les mammifères. *In vitro*, PAC1 et PAC2 forment un hétérodimère. Un complexe formé des 7 sous-unités α , de PAC1 et de PAC2 mais dépourvu de sous-unités β est isolé *in vivo* par immunoprécipitation. PAC1 et PAC2 sont également associées à l'hémiprotéasome jusqu'à la formation des formes matures du 20S. Pour caractériser plus avant la fonction du complexe PAC1-PAC2, des siRNA (short interfering RNA) ont été utilisés pour éteindre l'expression de leur gène respectif. En résulte l'accumulation des sous-unités α au sein de complexes correspondant à des dimères d'anneaux α , ce qui indique que l'hétérodimère PAC1-PAC2 a un rôle clé dans l'assemblage du 20S en empêchant la dimérisation des anneaux α , les maintenant ainsi dans un état propre à lier les sous-unités β et à poursuivre la formation du 20S. PAC1 et PAC2 ont une demie-vie courte et similaire estimée par pulse chase à une quarantaine de minutes. Leur demie-vie est de plus prolongée quand les cellules sont traitées au MG132, un inhibiteur du protéasome, ce qui suggère que PAC1 et PAC2 sont dégradées par le protéasome. La durée d'assemblage du 20S est estimée à 1h chez les mammifères (Ahn et al, 1996) ; la demie-vie de PAC1 et PAC2 est donc compatible avec un rôle de chaperon du 20S pour l'hétérodimère PAC1-PAC2 suivi de sa dégradation une fois l'assemblage terminé. Afin de déterminer si PAC1 et PAC2 se fixent à l'anneau α pré-assemblé ou si elles participent à sa formation, Hirano *et al.* ont testé l'interaction du complexe PAC1-PAC2 avec chaque sous-unité α *in vitro*, et ont détecté une association spécifique avec les sous-unités $\alpha 5$ et $\alpha 7$. Toujours *in vitro*, l'interaction d' $\alpha 5$ avec les 6 autres α est augmentée en présence de PAC1-PAC2. Enfin, Hirano *et al.* ont identifié *in vivo* un complexe PAC1-PAC2-sous-unités α duquel $\alpha 3$ et $\alpha 4$ sont absentes, confirmant que PAC1 et PAC2 s'associent aux α avant que l'anneau ne soit complet et pointant vers une incorporation ordonnée des sous-unités α au sein de l'anneau. L'ensemble de ces données indiquent que l'hétérodimère PAC1-PAC2 participe directement à l'assemblage de l'anneau α , tout en limitant la formation de dimères illégitimes et improductifs d'anneaux α (**figure I 25**). Ce n'est d'ailleurs certainement pas un hasard si PAC1-PAC2 interagit spécifiquement avec les sous-unités $\alpha 5$ et $\alpha 7$: leur capacité à s'auto-assembler en anneau heptamérique a été démontrée, tout comme leur propension à former des dimères ou des tétramères d'anneaux (voir ci-dessus). De plus, $\alpha 5$ peut induire *in vitro* la formation en anneau heptamérique de sous-unités α ($\alpha 1$ ou $\alpha 6$) qui en sont intrinsèquement incapables (Gerards et al, 1998). Le complexe PAC1-PAC2 pourrait donc servir à « canaliser » la capacité d'auto-assemblage d' $\alpha 5$ et $\alpha 7$, et à la diriger vers la formation d'un anneau α comprenant les 7 sous-unités. Il a été montré chez les mammifères que la phosphorylation de la sous-unité $\alpha 7$ augmente son incorporation au sein du protéasome (Rivett et al, 2001). Cette modification post-traductionnelle pourrait peut-être influencer l'interaction de PAC1-PAC2 avec $\alpha 7$. Enfin, sans trop en dévoiler, précisons seulement que le complexe homologue de PAC1-PAC2 chez *S. cerevisiae* a été très récemment identifié.

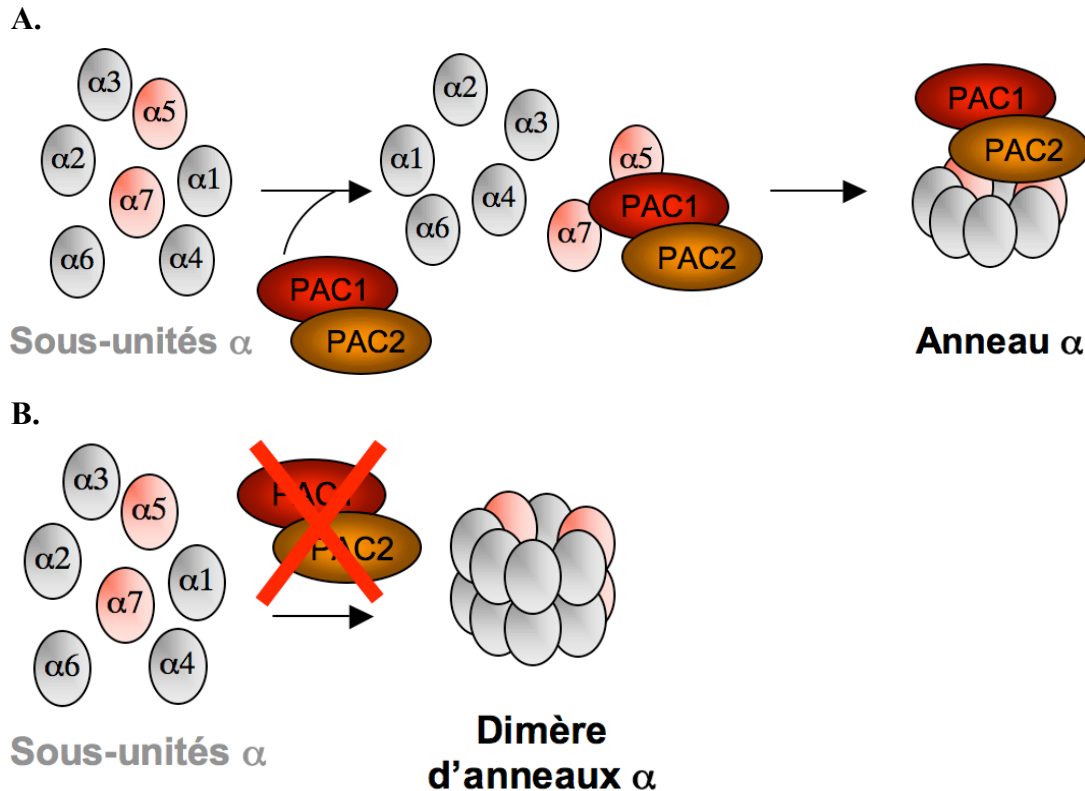


Figure I 25. Formation de l'anneau α assistée par l'hétérodimère PAC1-PAC2

A. Un hétérodimère PAC1-PAC2 se lie aux sous-unités $\alpha 5$ et $\alpha 7$ libres et sert de plateforme d'assemblage pour l'anneau α , auquel $\alpha 3$ et $\alpha 4$ semblent s'incorporer en dernier. PAC1 et PAC2 seront dégradées par le protéasome 20S à la fin de l'assemblage.

B. En absence de PAC1 et/ou PAC2, des dimères d'anneaux α sont susceptibles de se former.

Au vu des résultats que nous venons d'évoquer, il est évident qu'un anneau α correctement formé est indispensable à l'assemblage efficace du protéasome 20S. Or, chez la levure *S. cerevisiae*, un gène parmi les 7 codant les sous-unités α n'est pas essentiel. Il s'agit de *PRE9* codant la sous-unité $\alpha 3$ (Emori et al, 1991). Comment expliquer cette exception ? Velichutina et al. ont répondu à cette question en purifiant les protéasomes d'une souche *pre9Δ*. Ils ont ainsi montré que deux sous-unités $\alpha 4$ sont présentes, l'une prenant la place laissée vacante par $\alpha 3$ (Velichutina et al, 2004). Il existe donc une certaine plasticité au sein de l'anneau α du 20S. Cependant, la biogenèse du protéasome dans les mutants *pre9Δ* est perturbée, la formation des hémiprotéasomes étant particulièrement retardée (Velichutina et al, 2004), ce qui démontre qu'un positionnement correct des sous-unités α au sein de l'anneau est important pour les étapes suivantes d'assemblage. Le remplacement d' $\alpha 3$ par $\alpha 4$ et son impact mesuré sur le protéasome sont en accord avec les observations d'Hirano et al. qui suggèrent qu' $\alpha 3$ et $\alpha 4$ sont les dernières sous-unités α incorporées (voir ci-dessus).

Notons enfin que l'assemblage du protéasome 20S, et en particulier les premières étapes, diffère sensiblement chez certaines eubactéries. Le 20S de *Rhodococcus erythropolis* est composé de 2 sous-unités α et 2 sous-unités β différentes. Chaque sous-unité α ou β exprimée séparément reste à l'état de monomère, alors que la co-expression d'un couple α/β entraîne la formation d'un protéasome actif (Zuhl et al, 1997). *In vivo*, la formation d'un hétérodimère

α/β est observée au cours de l'assemblage, qui se poursuit néanmoins, comme chez les archéobactéries et les eucaryotes, par l'apparition d'un hémiprotéasome (Sharon et al, 2007).

3.5.1.2 Formation des hémiprotéasomes

3.5.1.2.1 Composition des hémiprotéasomes

5 des 7 sous-unités β (les 3 sous-unités β catalytiques $\beta 1/\beta 1i$, $\beta 2/\beta 2i$ et $\beta 5/\beta 5i$ ainsi que $\beta 6$ et $\beta 7$) sont synthétisées sous la forme de précurseurs comprenant un propeptide N-terminal qui est absent des protéasomes 20S (Heinemeyer et al, 2004). Une étape de maturation a donc lieu au cours de l'assemblage du 20S. On emploie le terme générique « hémiprotéasome » pour désigner les intermédiaires d'assemblage contenant l'anneau α et les formes précurseurs des sous-unités β (ainsi que les protéines chaperonnes PAC1-PAC2 et Ump1, voir ci-dessous).

Travaillant sur les immunoprotéasomes, Patel *et al.* ont été les premiers à décrire des sous-complexes du protéasome 20S comprenant spécifiquement les formes précurseurs de $\beta 1i$ et $\beta 5i$, suggérant qu'ils correspondent à des complexes précurseurs du 20S (Patel et al, 1994). Peu après, Frentzel *et al.* puis Yang *et al.* ont confirmé par des expériences de marquage radioactif en pulse-chase que le protéasome 20S s'assemble irréversiblement à partir d'intermédiaires d'assemblage (13S pour Frentzel, 15S pour Yang) contenant les α et les précurseurs des sous-unités β (Frentzel et al, 1994; Yang et al, 1995). Yang *et al.* ont analysé la composition en sous-unités du 15S et ont détecté la présence des 7 sous-unités α ainsi que de sous-unités β dont les 3 sous-unités catalytiques $\beta 1i$, $\beta 2i$ et $\beta 5i$ sous la forme de précurseurs. Ils ont alors proposé un modèle d'assemblage du 20S où l'anneau α est tout d'abord formé et sert de plateforme d'assemblage aux 7 sous-unités β , donnant naissance à un hémiprotéasome, 2 hémiprotéasomes s'associant pour former le 20S mature, un processus couplé au clivage des propeptides N-terminaux (Yang et al, 1995). Un modèle étonnamment proche du modèle actuel (**figure I 27**), qui sera d'ailleurs vite repris et complété, en particulier pour ce qui concerne l'ordre d'assemblage des β . Un intermédiaire d'assemblage 13S (celui-là même identifié par Frentzel *et al.*) précède en effet le 15S. Il est composé d'un anneau α , de $\beta 3$, $\beta 4$ et de la forme précurseur de $\beta 2$, chez les mammifères comme chez la levure (Frentzel et al, 1994; Schmidtke et al, 1997; Li et al, 2007) (**figure I 26**). Le premier intermédiaire d'assemblage détecté pour l'immunoprotéasome comprend l'anneau α , $\beta 3$, $\beta 4$ et les formes précurseurs de $\beta 1i$ et $\beta 2i$; les sous-unités $\beta 5i$, $\beta 6$ et $\beta 7$ s'incorporent par la suite (Nandi et al, 1997). Des études récentes chez la levure ont montré que la sous-unité $\beta 7$ est absente du 15S et est intégrée en dernier au protéasome (voir paragraphe 3.5.1.3.4) (**figure I 26**). Le complexe 16S (également identifié par Frentzel *et al.*) contenant toutes les sous-unités α et β a été décrit chez les mammifères (Frentzel et al, 1994; Schmidtke et al, 1997; Witt et al, 2000).

3.5.1.2.2 Fonction(s) des propeptides des sous-unités β

Le propeptide de la sous-unité β de l'archéobactérie *T. acidophilum* n'est pas nécessaire à l'assemblage du protéasome (Zwickl et al, 1994). Au contraire, plusieurs études chez les eucaryotes ont rapporté que les propeptides de certaines sous-unités β ont un rôle crucial dans la biogenèse du 20S. Le propeptide de $\beta 5$ (correspondant aux acides aminés situés en amont de la thréonine 76 qui deviendra la thréonine 1 active après clivage) est ainsi indispensable à

son incorporation au sein du protéasome chez *S. cerevisiae*. Il est donc essentiel à la viabilité cellulaire. De plus, il peut agir en *trans* : même séparé du domaine mature de $\beta 5$, il est capable de permettre son intégration dans le protéasome. Le propeptide de $\beta 5$ peut ainsi être considéré comme un chaperon intramoléculaire (Chen & Hochstrasser, 1996). La fonction du propeptide de $\beta 5$ ne peut cependant pas être généralisée à l'ensemble des propeptides des sous-unités β de la levure : l'absence des propeptides de $\beta 1$ ou $\beta 2$ n'est pas létale et n'entraîne pas de défaut majeur d'assemblage du protéasome (Arendt & Hochstrasser, 1999). Les propeptides diffèrent significativement en taille en en séquence, et ne sont pas interchangeables : une protéine chimère constituée du propeptide de $\beta 1$ et du domaine mature de $\beta 5$ ne s'incorpore pas au protéasome (Chen & Hochstrasser, 1996). Une fonction commune aux propeptides des 3 sous-unités β catalytiques visant à protéger la thréonine N-terminale catalytique d'une N α -acétylation inactivatrice a été proposée par Arendt *et al.* (Arendt & Hochstrasser, 1999).

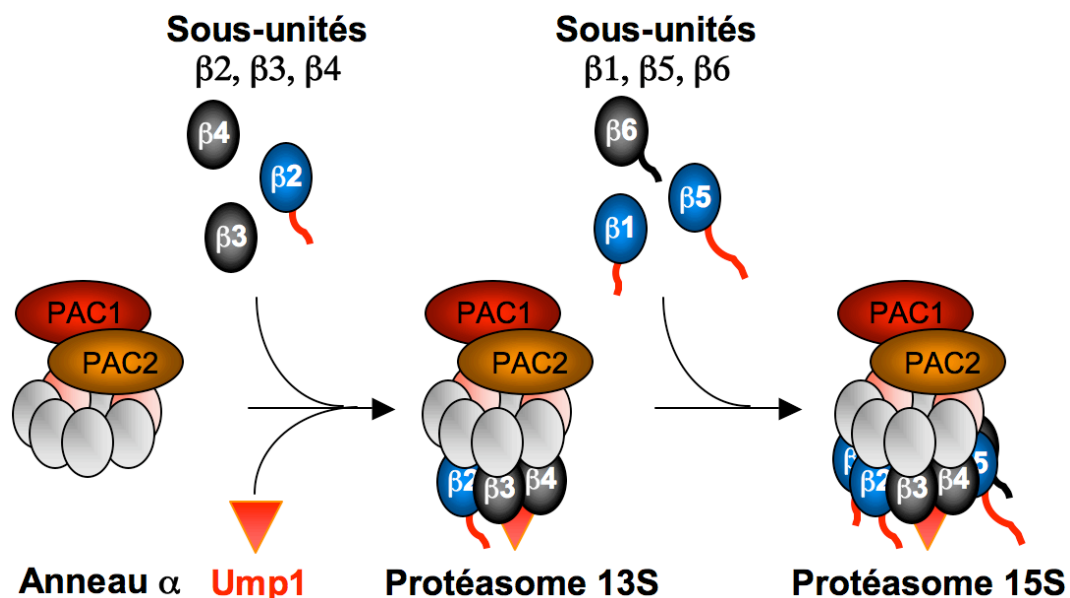


Figure I 26. Formation des complexes précurseurs 13S et 15S

Après l'anneau α , le second intermédiaire d'assemblage détecté chez les eucaryotes correspond au protéasome 13S, composé de l'anneau α et des sous-unités $\beta 2$ (sous forme précurseur), $\beta 3$ et $\beta 4$. S'ensuit l'incorporation de $\beta 1$, $\beta 5$ et $\beta 6$ pour former le 15S. Le propeptide de $\beta 5$ est indispensable à son incorporation dans le protéasome chez la levure *S. cerevisiae*. La protéine chaperonne Ump1 est détectée dès le complexe 13S. Les sous-unités β catalytiques sont en bleu, les propeptides sont figurés par des « queues » rouges ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 5$) ou noire ($\beta 6$).

Le rôle et l'influence des propeptides semblent quelque peu différents chez les mammifères. Comme chez la levure pour $\beta 1$, l'absence du propeptide de $\beta 1$ n'affecte pas l'incorporation de la sous-unité dans le protéasome (Schmidt *et al.*, 1999). Mais contrairement à $\beta 5$ de *S. cerevisiae*, le propeptide de $\beta 5$ n'est pas indispensable à l'intégration de $\beta 5$ dans le protéasome (Witt *et al.*, 2000). L'incorporation de $\beta 5$ en absence de son propeptide est néanmoins peu efficace. Elle provoque de plus un important retard de maturation du protéasome et l'accumulation des complexes précurseurs (Witt *et al.*, 2000). Des données plus anciennes avaient d'ailleurs conclu à un défaut total d'incorporation en absence de pro $\beta 5$ (Cerundolo *et al.*, 1995). Schmidtke *et al.* ont montré qu'une protéine chimère formée du propeptide de $\beta 5$ et de la forme mature de $\beta 1$ est incorporée au protéasome mais n'est pas

convenablement maturée, des formes intermédiaires de clivage étant retrouvées dans le 20S. Chez les mammifères, la fonction des propeptides, plutôt que le ciblage au protéasome, serait donc d'assurer le positionnement précis des précurseurs permettant un clivage efficace des propeptides (Schmidtke et al, 1996).

3.5.1.2.3 Fonction(s) des extensions C-terminales des sous-unités β

En plus des propeptides, les extensions C-terminales de certaines β influencent l'assemblage du protéasome. Il a ainsi été montré que la partie C-terminale de la sous-unité catalytique $\beta 2$, qui s'enroule autour de $\beta 3$ au sein du même anneau (Groll et al, 1997; Unno et al, 2002), est essentielle à la biogenèse du protéasome chez *S. cerevisiae* (Ramos et al, 2004). La délétion des 30 résidus carboxyterminaux de $\beta 2$ /Pup1 est létale ; une explication possible est que la sous-unité $\beta 3$, maintenue en place par $\beta 2$, ne peut pas s'incorporer correctement en absence de cette queue C-terminale, conduisant à un défaut d'assemblage et de maturation du protéasome (Ramos et al, 2004). La queue C-terminale de $\beta 7$ est également un acteur important de l'assemblage du protéasome (voir paragraphe 3.5.1.3.4).

3.5.1.3 Dimérisation des hémiprotéasomes

Il est fréquent que les protéases soient synthétisées avec un propeptide N-terminal qui inhibe leur activité protéolytique, empêchant ainsi une activation non-régulée et la dégradation illégitime de protéines. Dans le cas du protéasome, il a été proposé très tôt que le clivage des précurseurs des sous-unités β soit étroitement lié à la formation du 20S mature à partir des hémiprotéasomes, chez les mammifères (Frentzel et al, 1994; Yang et al, 1995) comme chez la levure (Chen & Hochstrasser, 1995).

3.5.1.3.1 Couplage de la dimérisation et du clivage des précurseurs

En 1996, au cours de leur étude sur les propriétés du propeptide de $\beta 5$ chez *S. cerevisiae*, Chen et Hochstrasser ont analysé le mécanisme de formation des sites catalytiques du protéasome (Chen & Hochstrasser, 1996). Peu auparavant, il avait été démontré que le protéasome de l'archéobactérie *T. acidophilum* est une protéase à thréonine, le résidu thréonine actif étant localisé à l'extrémité N-terminale de la forme β clivée (Lowe et al, 1995; Seemuller et al, 1995). A cette époque, 3 sous-unités β eucaryotes sur les 7 ($\beta 1$, $\beta 2$ et $\beta 5$) sont apparues posséder les résidus requis pour être catalytiquement actives. 2 résidus en particulier sont rigoureusement conservés : la glycine immédiatement en amont du site de clivage, et la thréonine immédiatement en aval, qui deviendra la thréonine active (Chen & Hochstrasser, 1995; Seemuller et al, 1995). Après avoir montré que la sous-unité $\beta 5$ est intégrée à l'hémiprotéasome grâce à son propeptide N-terminal, Chen et Hochstrasser se sont penchés sur le rôle du clivage de pro $\beta 5$. Pour ce faire, ils ont muté les résidus glycine et thréonine flanquant le site de coupure du propeptide, et ont obtenu des formes non-clivables de pro $\beta 5$. Ils ont alors montré qu'une forme mutante $\beta 5$ dont le propeptide ne peut être clivé est incorporée au protéasome, mais que le protéasome mutant demeure catalytiquement inactif pour l'activité de type chymotrypsine, alors que ses autres activités protéolytiques (de type trypsine et caspase) ne sont pas affectées. Le clivage du propeptide de $\beta 5$ n'est donc pas nécessaire à l'assemblage du protéasome mais est indispensable, spécifiquement, à l'activation de l'activité chymotrypsique portée par $\beta 5$ en révélant sa thréonine active (devenue N-terminale) (Chen & Hochstrasser, 1996).

L'absence de formes précurseurs des β dans les protéasomes 20S ou d'intermédiaires d'assemblage contenant des sous-unités β matures avait déjà suggéré que les étapes finales de formation du 20S, c'est à dire la dimérisation de 2 hémiprotéasomes et le clivage des propeptides, se déroule de façon très rapprochée (Frentzel et al, 1994; Yang et al, 1995). En montrant que l'interaction de la sous-unité $\beta 4$ avec la forme précurseur de $\beta 5$ à l'interface entre 2 anneaux β est indispensable au clivage de pro $\beta 5$, Chen et Hochstrasser ont fortement accrédité l'hypothèse d'un couplage entre le clivage des propeptides et la dimérisation des hémiprotéasomes (Chen & Hochstrasser, 1996). Un tel mécanisme associant étroitement assemblage et maturation empêche ainsi l'activation des sites catalytiques jusqu'à ce qu'une chambre protéolytique confinée soit formée par l'association de 2 hémiprotéasomes.

3.5.1.3.2 Clivage autocatalytique des précurseurs

Chen et Hochstrasser ont proposé que la formation des sites catalytiques du protéasome 20S mature repose sur des interactions spécifiques entre les 2 anneaux β centraux (Chen & Hochstrasser, 1995). Puis l'ont démontré. L'interaction de $\beta 5$ d'un hémiprotéasome avec la sous-unité $\beta 4$ de l'autre hémiprotéasome est en effet cruciale pour l'activité de type chymotrypsique du protéasome. Cette même interaction est également indispensable au clivage du propeptide de $\beta 5$. En d'autres termes, la juxtaposition inter-anneaux β de $\beta 5$ avec $\beta 4$ permet la mise en place d'une conformation tout à la fois apte à activer le site catalytique de $\beta 5$ et à cliver son propeptide ; ces données suggèrent donc que le propeptide de $\beta 5$ est clivé de manière autocatalytique (Chen & Hochstrasser, 1996).

En parallèle, des travaux réalisés sur la sous-unité $\beta 1i$ ont confirmé *in vitro* que les propeptides des sous-unités β catalytiques sont séparés des domaines matures par autolyse entre les résidus glycine -1 (précédant la thréonine active) et la thréonine 1 (la thréonine active) (Schmidtke et al, 1996). Enfin, contrairement à la sous-unité β de *T. acidophilum* pour lequel a été proposé un clivage autocatalytique intermoléculaire du précurseur de la sous-unité β (Seemuller et al, 1996), Schmidtke *et al.* ont suggéré une autolyse intramoléculaire en *cis*, ayant observé que le clivage autocatalytique de pro $\beta 1i$ est indépendant de la présence des autres sous-unités β actives et que, réciproquement, le clivage de $\beta 2i$ et $\beta 5i$ n'est pas affecté par une forme mutante non-clivable de pro $\beta 1i$ (Schmidtke et al, 1996). Ces observations font d'ailleurs parfaitement écho aux résultats de Chen et Hochstrasser, en particulier au fait que l'abolition du clivage de pro $\beta 5$ affecte uniquement et spécifiquement l'activité chymotrypsique (Chen & Hochstrasser, 1996). Même si la présence de 2 sous-unité catalytiques identiques, une au sein de chaque hémiprotéasome, rend difficile une telle conclusion, des études structurales ont depuis conforté le modèle d'autolyse en *cis* des sous-unités β (Ditzel et al, 1998; Groll et al, 1999).

En résumé, l'association des 2 hémiprotéasomes permet la mise en place de conformations spécifiques capables d'induire le clivage autocatalytique des propeptides des sous-unités β . Cette étape est évidemment cruciale dans l'assemblage du 20S, et l'identification chez la levure d'Ump1, une protéine chaperonne assistant ce processus, a confirmé cette vision.

3.5.1.3.3 Ump1, LE chaperon du protéasome 20S

Bien qu'elle agisse à une étape plus tardive de l'assemblage que PAC1 et PAC2, Ump1 (Ubiquitin-Mediated Proteolysis 1) a été le premier chaperon du protéasome identifié, et ce grâce à un crible génétique réalisé chez *S. cerevisiae* visant à isoler des mutants déficients pour la protéolyse ubiquitine-dépendante, d'où son nom (Ramos et al, 1998). Contrairement à la majorité des gènes codant les sous-unités du protéasome, *UMP1* n'est pas essentiel chez la levure. La stabilisation de divers substrats de l'UPS, l'accumulation de protéines polyubiquitinylées, la thermosensibilité ou encore la sensibilité à la canavanine (un analogue de l'arginine qui entraîne la synthèse de protéines anormales devant être dégradées par le protéasome, (Heinemeyer et al, 1993)) observées pour une souche *ump1Δ* sont autant de phénotypes partagés par des mutants du protéasome et indiquent l'appartenance d'Ump1 au système ubiquitine-protéasome. La caractérisation biochimique d'Ump1 s'est révélée encore plus intéressante : par des analyses de gel-filtration (aussi appelée chromatographie d'exclusion) et d'immunoprécipitation, Ramos *et al.* ont montré qu'Ump1 est un composant des complexes précurseurs 15S du protéasome, mais qu'elle est absente du protéasome 20S mature. Les défauts de protéolyse observés dans le mutant *ump1Δ* étaient donc susceptibles d'être liés à un défaut de biogenèse du protéasome, ce qui a été démontré : une accumulation considérable des 3 sous-unités β catalytiques sous forme précurseur est détectée dans la souche *ump1Δ*, et des formes précurseurs sont retrouvées au sein des protéasomes matures. Des expériences de marquage radioactif en pulse chase ont confirmé que le clivage des précurseurs est presque complètement inhibé en absence d'Ump1. La protéine Ump1 est donc indispensable à une maturation correcte du protéasome. Les trois activités protéolytiques cellulaires totales du protéasome ne sont néanmoins que modérément affectées dans le mutant *ump1Δ*. Une augmentation de l'expression des sous-unités du protéasome semble en effet compenser au moins partiellement la diminution d'activité des protéasomes matures, ce qui pourrait expliquer que la souche *ump1Δ* est viable malgré un ralentissement de croissance. Un mécanisme compensatoire similaire avait déjà été observé chez les mammifères pour des mutants des sous-unités β (Arendt & Hochstrasser, 1997). De façon inattendue, une activité chymotrypsique significative est détectée au niveau du complexe précurseur 15S dans le mutant *ump1Δ*, alors que ce complexe est parfaitement inactif dans une souche sauvage. Cette activité semble corrélée à la présence de formes intermédiaires de clivage des pro β 5 au sein du 15S, ce qui suggère qu'Ump1 est également nécessaire pour empêcher un clivage prématuré de β 5/Pre2. Ce lien privilégié entre pro β 5 et Ump1 a été approfondi par Ramos *et al.* qui ont montré que le propeptide de β 5 n'est plus essentiel à la viabilité cellulaire dès lors qu'Ump1 est absente. Ce résultat suggère qu'Ump1 est intégrée au complexe précurseur du protéasome avant β 5, puis qu'elle empêche toute incorporation de β 5 dépourvue de propeptide. L'association d'Ump1 avec le complexe précurseur 13S formé de l'anneau α et des sous-unités β 2, β 3 et β 4 détectée par Li *et al.* est cohérente avec un tel modèle (Li et al, 2007).

Enfin, Ramos *et al.* ont déterminé les causes de l'absence d'Ump1 du protéasome mature. Ump1 est une protéine à faible demi-vie *in vivo*, dont la cinétique de disparition mime celle du clivage des propeptides des β , en particulier β 2/Pup1. De plus, Ump1 est stabilisée dans un mutant du protéasome à activité protéolytique réduite, le mutant *β 4/pre1-1*. Ump1 est donc un substrat du protéasome. Plus précisément, Ump1 est retrouvée associée au 20S dans le mutant *β 4/pre1-1*, sous une forme inaccessible aux anticorps ou à la trypsine en conditions natives, ce

qui suggère qu'elle se trouve enfermée à l'intérieur du protéasome mutant mature, attendant d'être dégradée (Ramos et al, 1998).

L'ensemble de ces données ont conduit les auteurs de l'étude à proposer un modèle élégant où Ump1 s'associe avec les hémiprotéasomes et coordonne leur dimérisation avec le clivage des propeptides des sous-unités β (**figures I 26 et I27**). Ump1 se retrouve alors enfermée à l'intérieur du protéasome nouvellement formé et devient son premier substrat. Une activité chaperonne régulée de façon parfaitement exquise.

Un homologue d'Ump1 (appelé protéasassembline, hUmp1 ou POMP pour Proteasome Maturation Protein) a été identifié chez les mammifères (Burri et al, 2000; Griffin et al, 2000; Witt et al, 2000). Sa fonction est très similaire malgré une faible identité de séquence (de l'ordre de 20%) ; il participe à l'assemblage des protéasomes constitutifs aussi bien que des immunoprotéasomes (Griffin et al, 2000), et son expression est induite par l'interféron γ (Burri et al, 2000). Cependant, les protéines Ump1 levure et mammifère ne sont pas interchangeables (Burri et al, 2000), ce qui pourrait être lié aux spécificités différentes des propeptides des sous-unités β chez la levure et les mammifères.

3.5.1.3.4 Rôle(s) de $\beta 7$

L'architecture du protéasome 20S de *S. cerevisiae* dévoilée par cristallographie a révélé que la sous-unité $\beta 7$ /Pre4 possède une extension C-terminale de 15 acides aminés qui se projette d'une moitié du protéasome vers l'autre où elle s'insère entre les sous-unités $\beta 1$ /Pre3 et $\beta 2$ /Pup1 (Groll et al, 1997). Ramos *et al.* ont montré que cette queue C-terminale facilite la formation et la stabilisation du 20S à partir de 2 hémiprotéasomes. Sa délétion conjuguée à une mutation *ump1 Δ* entraîne un ralentissement synthétique de croissance (Ramos et al, 2004). Très récemment, 2 études ont révélé que $\beta 7$ /Pre4 est la seule parmi les 14 sous-unités du 20S à être absente des protéasomes 15S purifiés chez *S. cerevisiae* (Li et al, 2007; Marques et al, 2007). De plus, $\beta 7$ /Pre4 n'est pas détectée sous forme libre (Marques et al, 2007). Ces résultats suggèrent que $\beta 7$ /Pre4 est la sous-unité limitante pour l'assemblage du protéasome et qu'une fois synthétisée elle est rapidement incorporée aux complexes précurseurs dont elle entraîne la dimérisation. L'accélération de la dimérisation des hémiprotéasomes dans des cellules surexprimant $\beta 7$ /Pre4 (visualisée par la réduction, légère mais significative, du taux de complexes précurseurs) est cohérente avec cette hypothèse (Marques et al, 2007) (**figure I 27**). Chez les mammifères, un complexe 16S contenant toutes les sous-unités α et β peut être détecté (Frentzel et al, 1994; Schmidtke et al, 1997; Witt et al, 2000), révélant certaines différences d'assemblage du protéasome 20S entre la levure et les mammifères.

En plus de son rôle dans l'assemblage, la queue C-terminale de $\beta 7$ semble également avoir une fonction importante au sein du protéasome mature chez la levure. L'interaction de $\beta 7$ /Pre4 avec $\beta 1$ /Pre3 stabilise ainsi une conformation spécifique du site actif de $\beta 1$ /Pre3, essentielle à son activité catalytique de type caspase (Ramos et al, 2004). $\beta 7$ illustre la difficulté qu'il y a parfois à séparer les rôles des sous-unités intrinsèques du protéasome dans l'assemblage et/ou la stabilité de la structure finale.

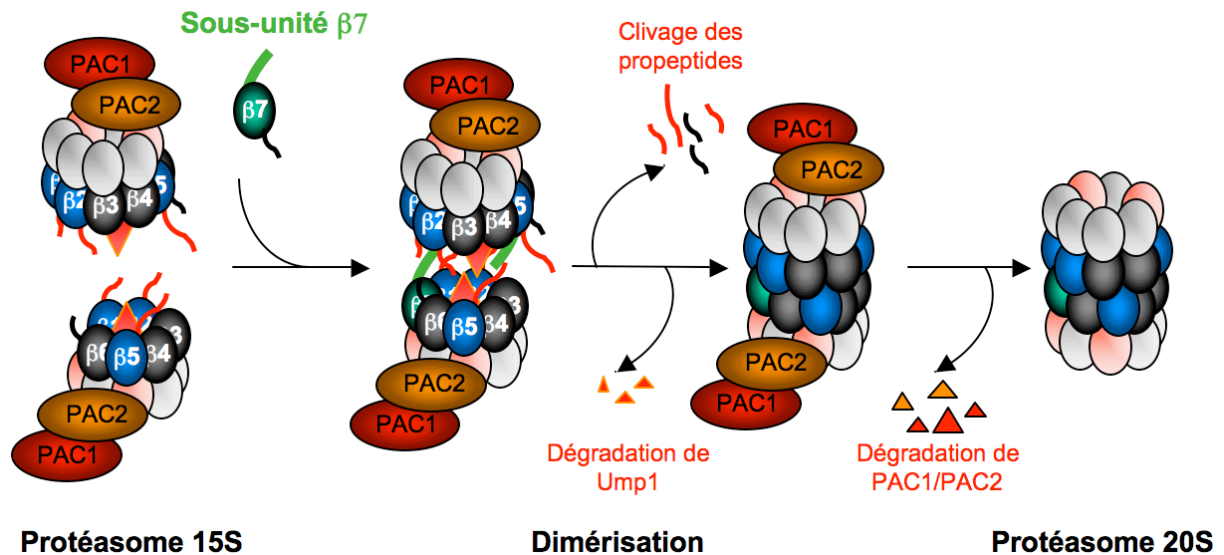


Figure I 27. Dimérisation des hémiprotéasomes et clivage autocatalytique des précurseurs

L'incorporation de la sous-unité $\beta 7$ entraîne, *via* sa queue C-terminale (en vert) la dimérisation de 2 hémiprotéasomes, qui induit la mise en place d'une conformation spécifique permettant le clivage autocatalytique des propeptides des sous-unités β . La protéine chaperonne Ump1 (au centre des hémiprotéasomes) coordonne l'association de 2 protéasomes 15S avec le clivage des propeptides des sous-unités β . Ump1 se retrouve alors enfermée à l'intérieur du protéasome nouvellement formé et devient son premier substrat. Les intermédiaires de dimérisation ont une très faible durée de vie chez *S. cerevisiae*, $\beta 7$ et Ump1 n'étant pas retrouvées au sein d'un même complexe. PAC1 et PAC2 sont dégradées par le protéasome 20S à la fin de l'assemblage.

3.5.1.3.5 Autres facteurs intervenant dans la maturation du protéasome 20S

Chez *S. cerevisiae*, le propeptide de la sous-unité $\beta 5$ est indispensable à son incorporation dans l'hémiprotéasome. En conséquence, l'absence de pro $\beta 5$ ($\Delta pro\beta 5$) est létale (voir paragraphe 3.5.1.2.2). Cette létalité peut être supprimée par l'absence d'Ump1 (voir paragraphe 3.5.1.3.3) ou la surexpression de $\beta 7/Pre4$, sauvetage aboli en absence de la queue C-terminale de $\beta 7/Pre4$ (Li et al, 2007). Ces résultats suggèrent un rôle pour le propeptide de $\beta 5$ dans la dimérisation des hémiprotéasomes chez la levure. Une fonction probablement conservée chez les mammifères, où l'absence de $\beta 5i$ provoque l'accumulation des complexes précurseurs des immunoprotéasomes contenant $\beta 1i$ et $\beta 2i$ sous-forme non-clivée (Schmidt et al, 1999). A noter que la délétion du propeptide de la sous-unité non-catalytique $\beta 6$ peut également supprimer la létalité de $\Delta pro\beta 5$, ce qui suggère que $\beta 6$ sous forme précurseur inhibe, tout comme Ump1 (voir paragraphe 3.5.1.3.3), l'incorporation d'une sous-unité β maturée au sein des protéasomes précurseurs (Li et al, 2007). Cependant, alors que la délétion du propeptide de $\beta 6$ ainsi que des 9 résidus adjacents ($\Delta NTE-\beta 6$) est létale, une souche *ump1 Δ $\Delta NTE-\beta 6$* est viable ! Des interactions génétiques dont l'interprétation est complexe, mais qui pointent assurément vers un rôle de $\beta 6$ dans l'assemblage du protéasome (Li et al, 2007).

En plus des 7 sous-unités α , des 6 sous-unités β , de PAC1-PAC2 et d'Ump1, les complexes précurseurs 15S isolés par Marques *et al.* et Li *et al.* contiennent la protéine Blm10, une protéine à HEAT-repeat de 247kDa (Li et al, 2007; Marques et al, 2007). Une étude

précédente avait déjà identifié Blm10 (préalablement dénommée Blm3, ce qui prête parfois à confusion, (Doherty et al, 2004)) au sein des complexes précurseurs du protéasome (Fehlker et al, 2003). Blm10 peut également s'associer au protéasome 20S mature, majoritairement au sein de complexes hybrides 19S-20S-Blm10 (Schmidt et al, 2005; Li et al, 2007). Tout comme son nom, la fonction de Blm10 est controversée. Fehlker *et al.* ont proposé que Blm10 s'associe aux complexes précurseurs dans le noyau et empêche une activation prématurée du protéasome (Fehlker et al, 2003). Au contraire, Schmidt *et al.* ont conclu que Blm10, qui est l'homologue du complexe activateur PA200 mammifère (Ustrell et al, 2002), se lie à la surface des anneaux α et active le protéasome 20S (Schmidt et al, 2005; Iwanczyk et al, 2006). Marques *et al.* ont montré que l'absence combinée de Blm10 et de la queue C-terminale de β 7/Pre4 entraîne de graves défauts de croissance, suggérant un rôle au moins partiellement redondant de ces 2 protéines dans la stabilisation des complexes précurseurs et la promotion de leur maturation (Marques et al, 2007). Un rôle, toujours selon Marques *et al.*, potentiellement partagé par le 19S (Marques et al, 2007). Enfin, Li *et al.* ont proposé que Blm10 puisse s'associer à la surface des anneaux α tant que cette dernière est libre, ce qui pourrait limiter des interactions illégitimes entre la RP et des complexes protéasomes précurseurs (Li et al, 2007). Un rôle qui reste à clarifier, donc.

Les étapes initiales et finales d'assemblage, bien qu'elles restent encore à préciser, sont donc de mieux en mieux caractérisées. L'étape intermédiaire demeure mystérieuse, et une question majeure reste en suspens : comment β 2, β 3 et β 4 s'associent-elles à l'anneau α ? Au commencement de mon doctorat, aucun facteur externe assistant la formation du protéasome 13S n'était connu.

3.5.1.4 Importation nucléaire et maturation du protéasome 20S

Les protéasomes des eucaryotes supérieurs semblent équitablement répartis entre le noyau et le cytoplasme (Reits et al, 1997). Chez la levure, par contre, environ 80% des protéasomes sont localisés dans le noyau et à la périphérie nucléaire (Enenkel et al, 1998; Wilkinson et al, 1998; Russell et al, 1999). Le passage de macromolécules de plus de 9 nm de diamètre à travers les pores nucléaires est un processus actif nécessitant des transporteurs spécifiques appelés karyophérines ou importines (rappelons que le cylindre 20S a une longueur de 15nm pour 12 nm de diamètre). La karyophérine est un hétérodimère $\alpha\beta$ dont la sous-unité α reconnaît les protéines possédant un signal de localisation nucléaire (NLS), et la sous-unité β adapte le complexe protéique « cargo » au pore nucléaire et permet sa translocation dans le noyau (Talcott & Moore, 1999). Plusieurs NLS ont été identifiés pour les sous-unités α du 20S, mais aucun pour les sous-unités β (Rivett, 1998). Des études *in vivo* de localisation du protéasome utilisant des protéines fusionnées à la GFP chez les mammifères ont révélé que le 20S est transloqué extrêmement lentement à travers l'enveloppe nucléaire, suggérant que le protéasome n'est pas importé dans le noyau sous sa forme mature (Reits et al, 1997). Lehmann *et al.* ont montré chez *S. cerevisiae* (i) que la protéine chaperonne Ump1 est localisée majoritairement dans le noyau, (ii) qu'Ump1 interagit avec la karyophérine $\alpha\beta$, (iii) que les complexes précurseurs du protéasome s'accumulent dans le cytoplasme d'un mutant thermosensible de la karyophérine α , *srp1-49*, en conditions restrictives. Enfin, Lehmann *et al.* ont montré que seuls les NLS des complexes précurseurs sont accessibles à la karyophérine $\alpha\beta$ (Lehmann et al, 2002). Les différentes étapes d'assemblage du 20S ont donc lieu dans des

compartiments cellulaires différents. Les complexes précurseurs des protéasomes 20S sont formés dans le cytoplasme, puis sont importés par la karyophérine $\alpha\beta$ dans le noyau, où se déroulent les étapes finales de maturation. Ce mécanisme permet de plus l'importation nucléaire des sous-unités β , dépourvues de NLS.

Une voie de maturation alternative pourrait exister pour les protéasomes cytoplasmiques et ceux associés au reticulum endoplasmique. Il est ainsi envisageable que des modifications post-traductionnelles des sous-unités du protéasome permettent une localisation et une maturation en dehors du noyau. La phosphorylation d'une protéine peut par exemple modifier sa prise en charge par les transporteurs nucléaires (Hood & Silver, 1999) ; plusieurs études ont rapporté des phosphorylations différentielles des sous-unités α chez les mammifères, qui pourraient influencer la localisation du protéasome (Rivett, 1998). Alternativement, des protéines accessoires s'associant transitoirement avec le protéasome pourraient déterminer sa destination intracellulaire finale, comme cela a été proposé pour la protéine hEcm29 qui localise le 26S au niveau des compartiments sécrétoires des cellules humaines (Gorbea et al, 2004).

Tone *et al.* ont caractérisé chez *S. cerevisiae* un autre facteur fonctionnant dans les étapes finales de translocation nucléaire et d'assemblage du 20S, la protéine Nob1 (Tone & Toh, 2002). Nob1 est une protéine essentielle impliquée dans la maturation du 20S : le mutant thermosensible *nob1-4* présente une accumulation des sous-unités β précurseurs et une stabilisation d'Ump1 en conditions restrictives. De plus, Nob1 a une localisation nucléaire, et la sous-unité $\alpha 4$ s'accumule dans le cytoplasme des mutants *nob1-4*, suggérant un rôle de Nob1 dans la « réception » des complexes précurseurs au sein du noyau après leur translocation par la karyophérine $\alpha\beta$. Enfin, Nob1 a une courte demie-vie, qui est augmentée en présence de l'inhibiteur du protéasome MG132, et interagit avec le 19S, Tone *et al.* concluant que Nob1 est présente jusqu'à l'association du 19S avec le 20S puis est dégradée par le protéasome 26S.

3.5.1.5 Schéma général de l'assemblage du protéasome 20S

Un schéma général de l'assemblage du protéasome 20S récapitulant les données de la littérature est présenté dans la **figure I 28**.

3.5.2 Assemblage du complexe régulateur 19S

Bien que la caractérisation fonctionnelle du 19S ait considérablement progressé ces dernières années, l'assemblage de cet édifice macromoléculaire est encore très mal connu. L'existence de complexes régulateurs ATPasiques procaryotes analogues aux 6 Rpt de la base du 19S (Smith et al, 2006), puis la découverte par Glickman *et al.* que le 19S est composé de 2 sous-structures distinctes, la base et le couvercle, séparables biochimiquement (Glickman et al, 1998a), enfin l'homologie du couvercle avec le COP9/Signalosome et eIF3, 2 complexes fonctionnels *per se* (Glickman et al, 1998a; Hofmann & Bucher, 1998), ont tous suggéré que la formation de la base de la RP est indépendante de celle du couvercle. Les données expérimentales le démontrant s'accumulent peu à peu. A ce jour, aucun facteur externe d'assemblage de la RP n'est connu.

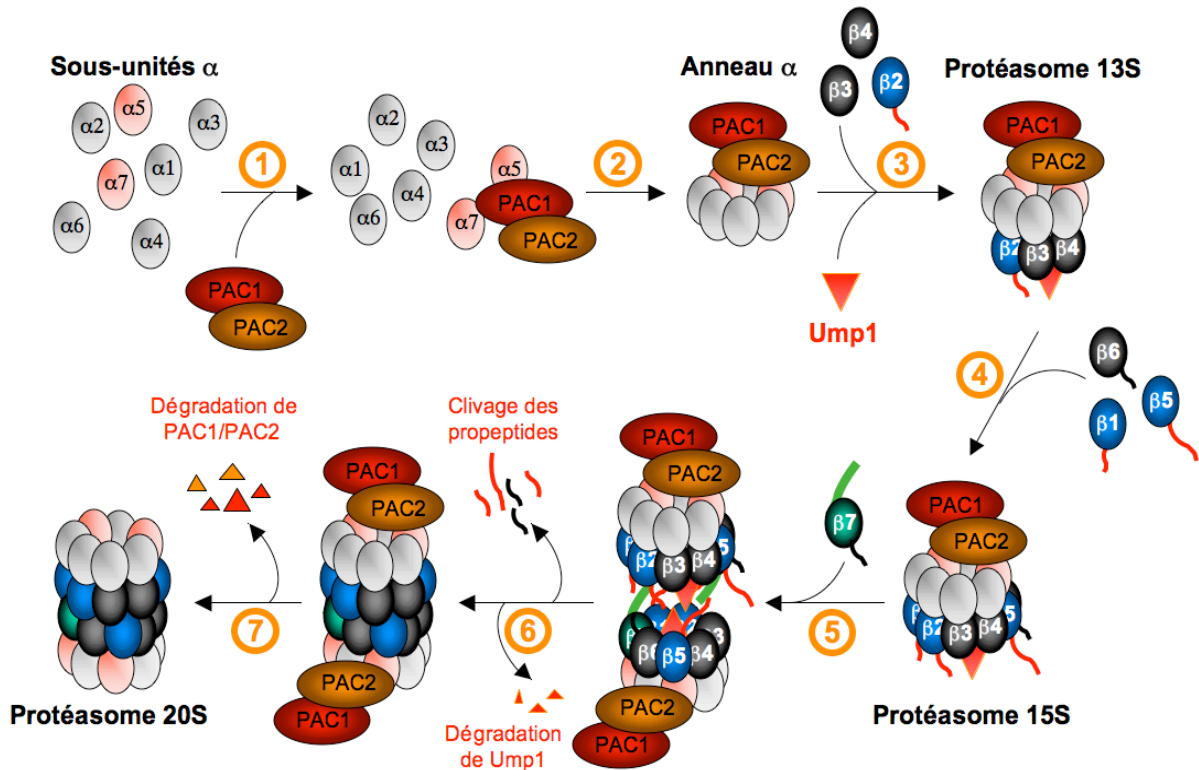


Figure I 28. Assemblage du protéasome 20S eucaryote

Un hétérodimère de protéines chaperonnes PAC1-PAC2 se lie aux sous-unités $\alpha 5$ et $\alpha 7$ libres (étape 1) et sert de plateforme d'assemblage pour l'anneau α (étape 2). Les sous-unités $\beta 3$, $\beta 4$ et la sous-unité catalytique $\beta 2$ sous forme précurseur, ainsi qu'un autre chaperon du protéasome, la protéine Ump1, se greffent sur l'anneau α (étape 3, protéasome 13S), suivies de $\beta 1$, $\beta 5$ et $\beta 6$ (toutes trois sous forme précurseur) pour former le 15S (étape 4). L'incorporation de la sous-unité $\beta 7$ entraîne, *via* sa queue C-terminale (en vert) la dimérisation de 2 hémiprotéasomes (étape 5), qui permet le clivage autocatalytique des propeptides des sous-unités β (étape 6). La protéine chaperonne Ump1 coordonne l'association de 2 protéasomes 15S avec le clivage des propeptides des sous-unités β (étapes 5 et 6). Ump1 se retrouve alors enfermée à l'intérieur du protéasome 20S nouvellement formé et devient son premier substrat (étape 6). PAC1 et PAC2 sont dégradées par le protéasome 20S à la fin de l'assemblage (étape 7). Les complexes précurseurs sont formés dans le cytoplasme, puis sont importés par la karyophérine $\alpha\beta$ dans le noyau, où se déroulent les étapes finales de maturation.

Ce modèle a été établi à partir de résultats obtenus tant chez les mammifères que chez la levure.

3.5.2.1 Assemblage de la base

A défaut de structure, il est communément admis, par analogie avec les complexes régulateurs ATPasiques procaryotes des protéases compartimentées et selon des observations de microscopie électronique (voir paragraphe 3.3.4.2.1), que les 6 sous-unités Rpt du 19S composent un anneau. Cette forte présomption a probablement freiné les recherches sur la formation de la base, quand bien même celle-ci contient 2 sous-unités supplémentaires non-ATPasiques (Rpn1 et Rpn2). Cependant, les études visant à préciser l'organisation de la base ont identifié plusieurs sous-complexes pouvant correspondre à des intermédiaires d'assemblage. Un sous-groupe comprenant Rpt 3, Rpt4, Rpt5 et Rpt6 a ainsi été décrit chez la levure par double-hybride (Fu et al, 2001), tandis qu'une approche *in vitro* utilisant les sous-unités ATPases mammifères a détecté 3 paires : Rpt1-Rpt2, Rpt3-Rpt6 et Rpt4-Rpt5, les 2 premières pouvant s'assembler en tétramère (Richmond et al, 1997). Lors de cette étude il a été suggéré que la partie N-terminale des 6 Rpt, organisée en hélices torsadées (« coiled-

coils ») putatives, est responsable de la spécificité des interactions observées et qu'elle est importante pour l'auto-assemblage du complexe Rpt (Richmond et al, 1997). Fu *et al.* et Gorbea *et al.* ont par la suite confirmé l'implication des domaines « coiled-coils » dans l'interaction des sous-unités Rpt (Fu et al, 2001; Gorebea et al, 2000). Il a également été montré que certaines ATPases recombinantes du 19S de la levure peuvent s'auto-assembler en complexes homo-oligomériques de haut poids moléculaire (Rpt1, Rpt3, Rpt4 et Rpt5) ou en hétérocomplexes (Rpt1 avec Rpt2) (Takeuchi & Tamura, 2004). *In vivo* et *in vitro*, la surexpression de Rpt4 ou Rpt6 conduit à la formation de complexes oligomériques (E. Rousseau, M. Glickman, communications personnelles). Enfin, une association directe et spécifique entre Rpn1 et Rpn2, qui formeraient ainsi un sous-complexe de la base, a été proposée (Rosenzweig et al, 2008), et une base dépourvue de Rpn2 est capable de se former *in vivo* (Isono et al, 2007).

Le modèle d'un auto-assemblage de l'hexamère des Rpt s'associant à un dimère Rpn1-Rpn2 reste cependant fragile : une autre étude *in vitro* a confirmé l'interaction Rpt1-Rpt2 mais a montré qu'une sous-unité non-ATPasique de la base, Rpn1, peut se lier à ce dimère (Gorbea et al, 2000). S5b, une sous-unité putative du 19S supposée mammifère-spécifique, est également capable de former un hétérotrimère avec Rpt1 et Rpt2. Plus, ce complexe peut s'assembler en un tétramère avec Rpn1 (Gorbea et al, 2000). S5b a été décrite comme un composant des 19S préparés à partir d'érythrocytes (Deveraux et al, 1995a), mais en absence de co-purification récurrente avec le protéasome et d'homologue identifié chez la levure, cette protéine est considérée comme une sous-unité tissu-spécifique des protéasomes humains. On pourrait au contraire voir en S5b un facteur favorisant la formation du trimère Rpt1-Rpt2-Rpn1, voire de la base, mais non présent dans la structure finale de la RP. Une pure spéculation ? Pas si sûr...

En conclusion, le modèle d'assemblage de la base reste encore flou, même si les sous-complexes identifiés semblent assez cohérents, notamment pour la paire Rpt1-Rpt2. Les différences observées pourraient être liées aux méthodologies expérimentales utilisées ou bien à de subtiles modifications des interactions entre sous-unités ou de l'assemblage au cours de l'évolution.

3.5.2.2 Assemblage du couvercle

La fonction précise de chacune des 9 sous-unités du couvercle du 19S est loin d'être connue. Il en va de même pour leur assemblage. Comme pour la base, les premières informations quant à la présence de sous-complexes au sein du couvercle, correspondant potentiellement à des intermédiaires d'assemblage, sont venues des analyses double-hybride qui ont identifié un « cœur » composé de Rpn5, Rpn6, Rpn8, Rpn9 et Rpn11, et un deuxième sous-groupe formé de Rpn3, Rpn12 et Rpn7 (Fu et al, 2001). La quasi-totalité des gènes des sous-unités du couvercle sont essentiels chez la levure, ce qui rend difficile leur étude. La délétion des gènes *RPN9* et *SEM1* et l'utilisation d'un mutant conditionnel de *RPN6* a montré l'importance de ces 3 sous-unités dans l'assemblage et/ou la stabilité du 19S (Takeuchi et al, 1999; Santamaria et al, 2003; Funakoshi et al, 2004; Sone et al, 2004). Mais c'est surtout l'isolation de mutants thermosensibles de *RPN5*, *RPN6* et *RPN7* par Isono *et al.* (Isono et al, 2004; Isono et al, 2005; Isono et al, 2007) qui, en plus de préciser la fonction de chacune de ces protéines au sein du protéasome, a permis de mieux caractériser l'assemblage du couvercle. Ainsi, la purification par affinité du couvercle à partir du mutant *rpn7-3* en conditions restrictives a révélé que seules 5 de ses 8 sous-unités (Sem1/Rpn15 n'était pas encore connue

à l'époque) sont présentes. Le premier exemple *in vivo* de couvercle partiellement assemblé – ou partiellement destabilisé (Isono et al, 2004). De plus, les 5 composants de ce sous-complexe, Rpn5-Rpn6-Rpn8-Rpn9-Rpn11, correspondent au « cœur » du couvercle identifié par DH (Fu et al, 2001). Isono *et al.* ont alors suggéré que Rpn7 sert à incorporer, ou à stabiliser, Rpn3 et Rpn12 au sein du couvercle, une hypothèse renforcée par la détection d'une interaction double-hybride entre Rpn7 et Rpn3 (Isono et al, 2004), lui-même connu pour interagir avec Rpn12 (Fu et al, 2001). Une approche similaire menée à nouveau par Isono *et al.*, cette fois sur des mutants thermosensibles de la sous-unité Rpn6, a affiné le modèle d'assemblage du couvercle (Isono et al, 2005). A haute température, les mutants *rpn6* accumulent des couvercles formés uniquement de 4 sous-unités, Rpn5, Rpn8, Rpn9 et Rpn11 – le coeur du « cœur » du couvercle. Bien que la distinction entre assemblage et stabilisation demeure ténue, Isono *et al.* ont proposé que Rpn6 s'incorpore au cœur du couvercle en interagissant avec Rpn5 (une interaction détectée en double-hybride), suivi de l'incorporation de Rpn7 qui recrute à son tour Rpn3, Rpn12 et Sem1 pour former un couvercle complet (**figure I 29A**). Logiquement, Isono *et al.* se sont ensuite intéressés au tétramère Rpn5-Rpn8-Rpn9-Rpn11 à l'aide de mutants *rpn5* thermosensibles (Isono et al, 2007). En conditions restrictives, aucun couvercle, même partiellement assemblé, n'est détecté dans le mutant *rpn5-1*, ce qui suggère que la formation du couvercle est complètement abolie. Rpn5 semble donc être un composant clé du cœur du couvercle, conformément aux prévisions ; de plus, ce coeur semble être le point de départ de l'assemblage du couvercle (Isono et al, 2007). Ces résultats sont globalement en accord avec le modèle de couvercle proposé par Sharon *et al.* d'après des analyses de pontage chimique couplé à la spectrométrie de masse, où le cœur du couvercle est formé d'un tétramère Rpn5-Rpn6-Rpn8-Rpn9 (Sharon et al, 2006a). Néanmoins, Sharon *et al.* ont proposé que le lien entre les clusters Rpn5-Rpn6-Rpn8-Rpn9-Rpn11 et Rpn3-Rpn7-Rpn12-Sem1 soit assuré par l'interaction entre Rpn5 et Rpn3, plutôt qu'entre Rpn6 et Rpn7 comme le suggèrent Isono *et al.* (Sharon et al, 2006a; Isono et al, 2007) (**figure I 29B**).

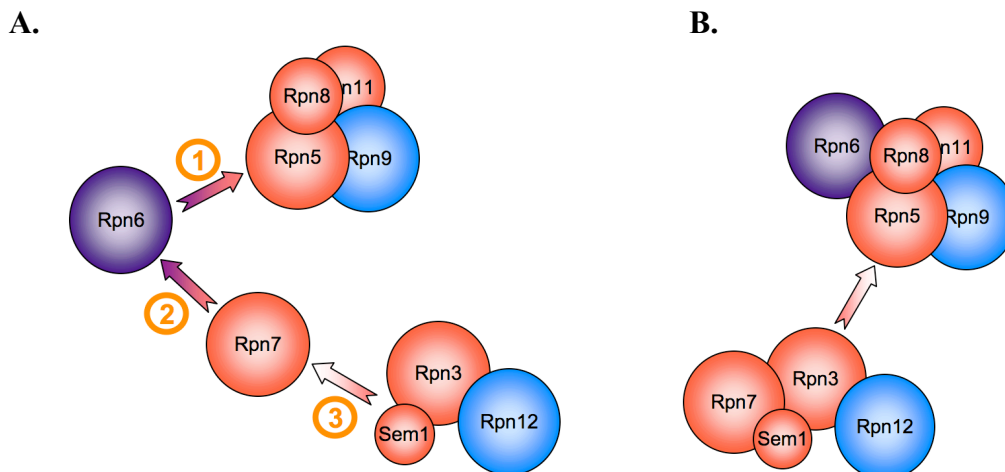


Figure I 29. Modèles d'assemblage du couvercle du complexe régulateur 19S

A. Modèle proposé par (Isono et al, 2007). Un cluster Rpn5-Rpn8-Rpn9-Rpn11 constitue le cœur du couvercle. Rpn6 est nécessaire à l'incorporation de Rpn7, qui recrute à son tour Rpn3, Rpn12 et Sem1/Rpn15.

B. Modèle proposé par (Sharon et al, 2006a). Le cluster composé de Rpn5-Rpn6-Rpn8-Rpn9-Rpn11 interagit avec le cluster Rpn3-Rpn7-Rpn12-Sem1 via l'interaction de Rpn5 avec Rpn3. Le code couleur renvoie à la **figure I 24** ; son rôle est purement esthétique.

6 sous-unités du couvercle (Rpn3, Rpn5, Rpn6, Rpn7, Rpn9 et Rpn12) possèdent un domaine PCI (Glickman & Ciechanover, 2002). Ces domaines favorisent les interactions protéine-protéine et jouent un rôle important dans l'incorporation des sous-unités au sein d'un complexe macromoléculaire, notamment dans le cas du couvercle du 19S ou du COP9/Signalosome (Fu et al, 2001; Scheel & Hofmann, 2005). Le changement d'un seul acide aminé au sein du domaine PCI du mutant conditionnel *rpn6-2* isolé par Isono *et al.* est ainsi très probablement à l'origine des défauts d'assemblage du couvercle (Isono et al, 2005). D'autres régions protéiques sont néanmoins impliquées dans les interactions entre sous-unités et dans la formation du couvercle, des mutations en dehors des domaines PCI de Rpn6 ou Rpn7 pouvant également abolir leur interaction double-hybride respective avec Rpn3 et Rpn5 (Isono et al, 2004; Isono et al, 2005).

3.5.2.3 Indépendance de l'assemblage de la base et du couvercle

Les études mentionnées ci-dessus le prouvent, l'assemblage de la base et du couvercle ont chacun été étudiés indépendamment. En fait, seuls Isono *et al.* ont regardé l'influence d'un mutant du couvercle sur l'assemblage de la base et *vice versa* (Isono et al, 2007). Ils ont ainsi montré que dans le mutant *rpn5-1*, où la formation du couvercle est abolie en conditions restrictives, une base apparemment intacte peut être purifiée ; de même, les 9 sous-unités du couvercle sont incorporées dans un mutant thermosensible de la base, $\Delta Nrpn2$, cultivé à haute température ($\Delta Nrpn2$ code une protéine Rpn2 dont la partie N-terminale a été tronquée). En conditions restrictives, une base dépourvue de Rpn2 est capable de se former mais le couvercle est présent sous forme libre, non-liée à la base dans ce mutant, ce qui suggère par ailleurs que Rpn2 joue un rôle important dans l'interaction base/couvercle. Ces résultats tendent à confirmer que les processus d'assemblage de la base et du couvercle de la RP sont bel et bien indépendants. L'association base-couvercle au cours de l'assemblage du 19S n'en demeure pas moins peu documentée et pour tout dire mystérieuse. On pense qu'elle a lieu dans le noyau.

3.5.2.4 Importation nucléaire et assemblage du complexe régulateur 19S

3.5.2.4.1 Importation nucléaire de la base

Chez la levure, la grande majorité des protéasomes 26S sont localisés dans le noyau (voir paragraphe 3.5.1.4). L'importation nucléaire des sous-complexes apparaît donc tout aussi importante que leur assemblage. Comme nous l'avons mentionné, les particules 20S sont importées dans le noyau sous la forme de complexes précurseurs par le transporteur hétérodimérique karyophérine $\alpha\beta$ (voir paragraphe 3.5.1.4). Wendler *et al.* ont étudié l'importation nucléaire du 19S chez *S. cerevisiae* et ont montré que la karyophérine $\alpha\beta$ en est le principal vecteur (Wendler et al, 2004). Ils ont de plus identifié un signal de localisation fonctionnel au sein de 2 sous-unités de la base, Rpt2 et Rpn2. Le NLS de Rpn2 est essentiel à la localisation nucléaire de la base et à la fonction du protéasome. La délétion du NLS de Rpt2 n'entraîne pas de phénotype évident, mais un mutant dépourvu à la fois des NLS de Rpn2 et Rpt2 n'est pas viable, suggérant que plusieurs NLS sont présents au sein de la base et qu'ils sont reconnus simultanément par la karyophérine $\alpha\beta$. L'ensemble de ces résultats indiquent enfin que la base est assemblée dans le cytoplasme avant d'être importée dans le noyau.

3.5.2.4.2 Importation nucléaire du couvercle

Des NLS putatifs sont présents au sein de certaines sous-unités du couvercle (Rpn6, Rpn8, Rpn9 et Rpn12). De plus, en conditions restrictives, le mutant thermosensible de la karyophérine α chez *S. cerevisiae*, *srp1-49*, présente un défaut de localisation nucléaire du couvercle. Mais contrairement à la base, le couvercle ne semble pas reconnu directement par la karyophérine α (Wendler et al, 2004). Il a été suggéré qu'une ou plusieurs protéines adaptatrices puissent assurer la reconnaissance du couvercle par la karyophérine α . Chez la levure fissipare, la délétion de Yin6/Int6, une protéine régulant la division cellulaire et la mitose *via* le protéasome, provoque la délocalisation de Rpn5 dans le cytosol. Rpn5 semble dépourvue de NLS, au contraire de Yin6/Int6 qui serait ainsi capable d'« accompagner » Rpn5, et potentiellement le couvercle, vers le noyau (Yen et al, 2003). Curieusement, Wendler *et al.* n'ont pas analysé les effets des mutants NLS de la base sur la localisation du couvercle de la RP – un *a priori* coupable sur l'indépendance des 2 processus ? Isono *et al.* ont réalisé une telle étude dans le mutant thermosensible $\Delta Nrpn2$, où le couvercle est présent sous forme libre. Ils ont alors observé que la localisation nucléaire du couvercle n'est pas modifiée dans ce mutant en conditions restrictives (Isono et al, 2007). L'analyse réciproque de la localisation de la base dans les mutants *rpn5-1* et *rpn7-3* du couvercle n'ayant pas révélé non plus de changement par rapport à une souche sauvage, il semble ainsi que l'importation nucléaire de la base et l'importation nucléaire du couvercle se déroulent indépendamment. Enfin, Isono *et al.* ont montré dans le mutant *rpn7-3* que le sous-complexe pentamérique Rpn5-Rpn6-Rpn8-Rpn9-Rpn11 n'est pas détecté dans le noyau. Ces résultats indiquent que le couvercle, comme la base, est assemblé dans le cytoplasme et suggèrent que les sous-unités Rpn3, Rpn7 et Rpn12 participent à l'importation nucléaire du couvercle (Isono et al, 2007).

3.5.2.4.3 Association base/couvercle

Récapitulons : la base et le couvercle s'assemblent indépendamment l'un de l'autre dans le cytoplasme, et sont importés indépendamment dans le noyau. Tout porte donc à croire que la RP est assemblée au sein de ce compartiment. Les premiers résultats de double-hybride ont suggéré que Rpn1 et Rpn2 sont importants pour l'association base/couvercle en contactant des sous-unités des 2 sous-complexes ((Fu et al, 2001) et voir paragraphe 3.3.4.2.3). La présence d'un couvercle intact non-lié à la base dans le mutant $\Delta Nrpn2$ semble confirmer cette vue (Isono et al, 2007), même si les données DH récentes de Chen *et al.* indiquent que de nombreux contacts entre la base et le couvercle sont établis (Chen et al, 2008). Hormis le rôle de Rpn10 dans la stabilisation (plutôt que l'assemblage) du 19S (Glickman et al, 1998a) (voir paragraphe 3.3.1), nous n'en connaissons guère plus à l'heure actuelle.

Une observation récurrente d'Isono *et al.* est particulièrement intéressante quant au rôle de l'association base-couvercle. En effet, pour les 3 mutants du couvercle qu'ils ont utilisés, *rpn7-3*, *rpn6* et *rpn5-1*, il a à chaque fois été constaté une diminution de l'interaction entre la base et le 20S (Isono et al, 2004; Isono et al, 2005; Isono et al, 2007), un phénotype aussi rapporté pour le mutant *sem1 Δ* (Funakoshi et al, 2004). Il est ainsi possible que le couvercle renforce la liaison base-CP en modifiant de manière allostérique l'interface de la base avec le 20S. Cependant, les observations d'Isono *et al.* ne renseignent pas sur le moment de cette modification : le couvercle peut exercer cet effet soit en s'associant à un complexe base-CP

préexistant¹⁰ et en stabilisant leur interaction, soit en se liant à la base pour former une particule régulatrice apte à interagir de manière stable avec le CP. Isono *et al.* favorisent la première hypothèse (Isono et al, 2007) ; nous pensons avoir certains arguments en faveur de la seconde (voir résultats) (**figure I 30**). Précisons enfin que l'association des sous-unités au sein de la RP est ATP-indépendante (Verma et al, 2000).

3.5.3 Formation du protéasome 26S

3.5.3.1 Association 19S-20S

Un prérequis à la dégradation des protéines polyubiquitinylées par le protéasome 26S est évidemment la formation du dit protéasome, c'est à dire l'association de la partie catalytique 20S avec le complexe régulateur 19S. Dès les premières études, il est apparu que les deux composants du « complexe multiprotéique de dégradation des protéines ubiquitinylées », le CP et la RP, s'assemblent de façon ATP-dépendante *in vitro* (Ganoth et al, 1988). Depuis, de nombreux travaux ont démontré que la formation de protéasomes 26S *in vitro* à partir de 20S et 19S purifiés demande de l'ATP (par exemple (Hoffman et al, 1992; DeMartino et al, 1994)). Une étude récente a précisé que la liaison de l'ATP est nécessaire et suffisante *in vitro* à l'assemblage du protéasome 26S mammifère, ainsi qu'à sa stabilité (Liu et al, 2006).

In vivo, des facteurs tels que le chaperon Hsp90 (Imai et al, 2003) régulent l'association 19S-20S et la stabilité du 26S. La protéine Ecm29 fait elle-aussi figure de candidat à l'assemblage du 26S. Ecm29 est un composant accessoire du protéasome, une protéine de grande taille (210kDa) qui semble attacher la RP au CP chez *S. cerevisiae* et stabiliser le 26S (Leggett et al, 2002; Kleijnen et al, 2007). Néanmoins, un rôle différent « d'adaptateur » permettant de recruter le protéasome 26S vers différents compartiments intracellulaires a été proposé pour l'homologue mammifère d'Ecm29 (Gorbea et al, 2004).

Selon Fujimuro *et al.*, des niveaux plus élevés de protéasome sont détectés en phase stationnaire par rapport à la phase exponentielle de croissance chez *S. cerevisiae* ; le passage de la phase de croissance à la phase stationnaire favorise également l'association du 19S et du 20S et les configurations RP₂-CP (Fujimuro et al, 1998a). Des résultats en parfaite contradiction avec les travaux de Bajorek *et al.* qui suggèrent que le protéasome 26S de la levure est désassemblé en 20S et 19S en phase stationnaire, une dissociation corrélée à la baisse de l'activité protéolytique des cellules (Bajorek et al, 2003). Chez les mammifères, la phosphorylation de la sous-unité de la base Rpt6 semble favoriser son interaction avec $\alpha 2$ et l'assemblage du 26S. *In vitro*, le traitement à la phosphatase alcaline du 26S entraîne quant à lui sa dissociation en 19S et 20S (Sato et al, 2001). La phosphorylation d' $\alpha 7$ semble elle aussi importante pour l'association 19S-20S (Rivett et al, 2001). Enfin, il a été suggéré que la présence d'un substrat en cours de dégradation stabilise le protéasome 26S de façon allostérique, ce qui favoriserait la processivité de la protéolyse (Kleijnen et al, 2007).

3.5.3.2 Dissociation 19S-20S

En plus de son rôle dans l'assemblage, l'ATP retarde la dissociation du 26S en sous-complexes CP et RP (Coux et al, 1996; Voges et al, 1999).

¹⁰ Des complexes base-CP ont été détectés dans le mutant *rpn10Δ* (Glickman et al, 1998a) et certains mutants du couvercle (Verma et al, 2002; Isono et al, 2007).

PAAF1, un facteur régulant négativement l'association RP/CP chez les mammifères, a été identifié récemment. PAAF1 interagit spécifiquement avec les ATPases de la base du 19S et inhibe l'activité du protéasome 26S en empêchant l'assemblage 19S-20S et/ou en favorisant la dissociation des complexes 26S en 19S et 20S (Park et al, 2005; Lassot et al, 2007). La protéine Rpn14 de *S. cerevisiae*, d'abord considérée comme une nouvelle sous-unité potentielle de la RP (Samanta & Liang, 2003) semble être un homologue de PAAF1 (Park et al, 2005).

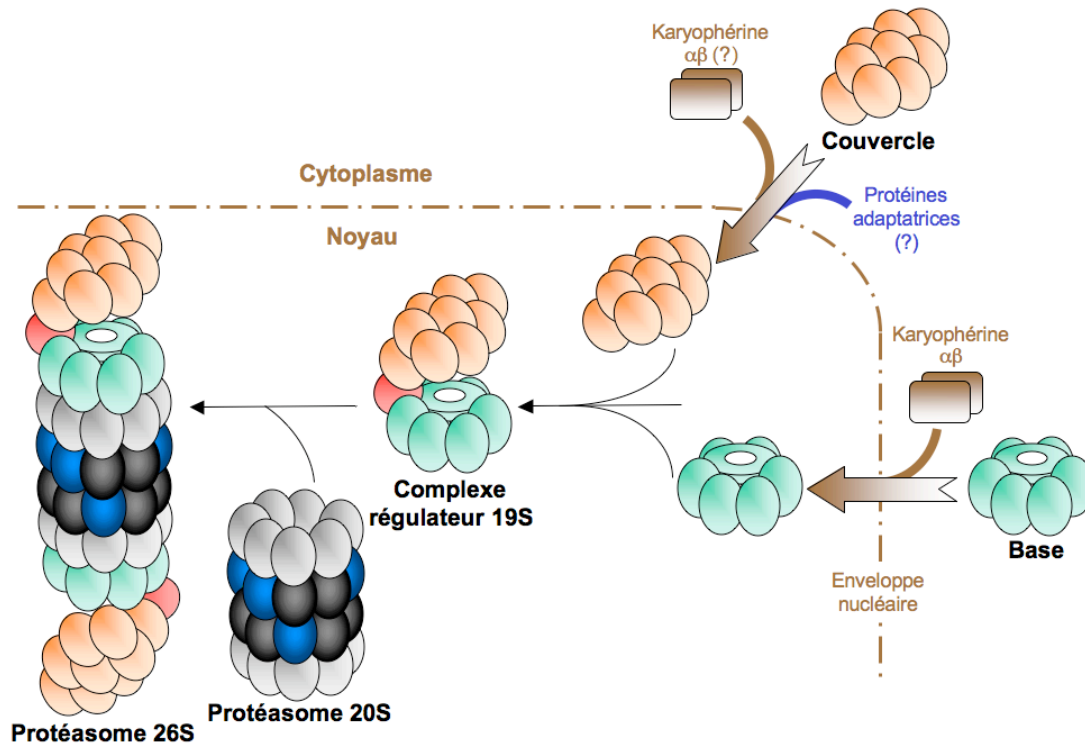


Figure I 30. Modèle d'assemblage du complexe régulateur 19S chez *S. cerevisiae*

Le couvercle et la base sont assemblés indépendamment dans le cytoplasme et importés indépendamment dans le noyau, où ils s'associent pour former le complexe régulateur 19S. Rpn10 (en rouge) se situe à l'interface entre la base et le couvercle et stabilise leur association. Isono et *al.* ont proposé que la base s'associe tout d'abord avec le protéasome 20S, puis que le couvercle s'assemble au complexe base-20S pour former le protéasome 26S (non représenté). Les représentations de la base et du couvercle proposées ici sont essentiellement conceptuelles.

Babbitt *et al.* ont montré qu'une dissociation contrôlée du 19S à partir du 26S pourrait participer au processus de dégradation (Babbitt et al, 2005). Ils ont en effet observé sur des protéasomes 26S purifiés que l'hydrolyse de l'ATP déclenche le démembrement du 19S en base, couvercle et Rpn10 libre. De plus, la dégradation du substrat semble essentielle à cette dissociation, qui permettrait ainsi la sortie des produits de clivage. Ces données apparaissent passablement contradictoires avec le modèle de Kleijnen *et al.* où le processus de dégradation réduit au contraire le désassemblage du 26S (Kleijnen et al, 2007).

3.5.3.3 Localisation du 26S

La régulation de la localisation du protéasome est cruciale pour son fonctionnement. Chez la levure, le protéasome est enrichi dans le noyau et l'enveloppe nucléaire (voir paragraphe 3.5.1.4). Sa distribution entre le cytoplasme et le noyau est plus homogène chez les eucaryotes supérieurs (Reits et al, 1997) ; dans certaines cellules, le ratio de protéasomes

cytoplasmiques/nucléaires varie au cours du cycle cellulaire (Amsterdam et al, 1993; Palmer et al, 1994; Lafarga et al, 2002). Nous avons déjà vu qu'il existe une coordination étroite entre l'assemblage du 20S et du 19S et leur importation nucléaire chez la levure (voir paragraphes 3.5.1.4 et 3.5.2.4). Un facteur semble également contrôler la localisation nucléaire du protéasome 26S, la protéine Cut8/Sts1 (chez *S. pombe*/*S. cerevisiae*) (Tatebe & Yanagida, 2000; Takeda & Yanagida, 2005). Ainsi, dans un mutant *cut8*, le protéasome 26S est majoritairement cytoplasmique (Tatebe & Yanagida, 2000). Cut8 interagit physiquement avec les sous-unités du 20S et du 19S *in vitro* et *in vivo*, une interaction favorisée par l'ubiquitinylation de Cut8, qui est de plus nécessaire à l'enrichissement nucléaire du 26S (une forme non-ubiquitinylable de Cut8 dont toutes les lysines ont été mutées en arginines ne permet pas l'enrichissement nucléaire du 26S) (Takeda & Yanagida, 2005). L'ubiquitinylation de Cut8 dépend de l'E2 Rhp6 (associé aux E3 Ubr1 et Rhp18) et, logiquement, l'interaction du protéasome avec Cut8 et sa localisation nucléaire sont abolies dans un mutant *rhp6Δ*. Enfin, la protéine Cut8 a une distribution cellulaire très proche mais indépendante de celle du protéasome. L'ensemble de ces données indique que la forme ubiquitinylée de Cut8 ancre le protéasome 26S (plutôt que ses sous-complexes ou des formes précurseurs) à l'intérieur du noyau. La dégradation de Cut8 par le protéasome permettrait alors son exportation dans le cytoplasme. Un système de rétrocontrôle négatif qui assure une régulation très fine de l'accumulation du 26S dans le noyau, requise notamment quand des protéines nucléaires abondantes doivent être détruites. Un homologue de Cut8/Sts1 a été identifié chez la drosophile (Takeda & Yanagida, 2005).

La protéine Yin6, parfois considérée comme un importateur nucléaire du couvercle (voir paragraphe 3.5.2.4.2) pourrait être, au même titre que Cut8, un régulateur de la localisation et de la fonction du protéasome 26S (Yen et al, 2003). L'inactivation de Yin6 entraîne ainsi la mort des mutants *cut8*; Yin6/Int6 se lie directement à Rpn5, mais une interaction avec le protéasome 26S dans sa globalité est aussi détectée *in vivo*. Enfin, seule la localisation de Rpn5 a été étudiée dans le mutant *yin6Δ*, ce qui n'empêche nullement que la localisation des autres sous-complexes du 26S soit aussi perturbée (généraliser au protéasome 26S un résultat obtenu pour une seule de ses sous-unités est par ailleurs un des biais de nombreuses études sur le protéasome, même s'il a désormais tendance à s'estomper).

Récemment, une relocalisation massive des sous-unités du protéasome au sein de structures cytoplasmiques appelées PSG (Proteasome storage granules) dans les cellules quiescentes a été décrite chez les levures *S. cerevisiae* et *S. pombe*. Ces granules serviraient de « réservoirs » de protéasomes rapidement mobilisés lors de la reprise du cycle cellulaire (Laporte et al, 2008).

3.5.4 Rpn4, un activateur transcriptionnel du protéasome chez *S. cerevisiae*

Les interactions protéine-protéine entre les différentes sous-unités du protéasome et la participation de facteurs chaperons jouent un rôle central dans l'assemblage du protéasome. Un mécanisme de régulation existe en fait dès l'expression des sous-unités du 26S, du moins chez *S. cerevisiae*, via la protéine Rpn4 (aussi appelée Son1 et Ufd5), un activateur transcriptionnel des sous-unités du protéasome (Mannhaupt et al, 1999; Xie & Varshavsky, 2001). Rpn4 (un temps considéré comme une sous-unité du 26S, (Fujimuro et al, 1998b)) se lie grâce à son domaine en doigts de zinc à une séquence spécifique de 8-9 nucléotides, la séquence PACE (Proteasome-Associated Control Element), retrouvée dans la région promotrice des gènes des sous-unités du protéasome 26S (Mannhaupt et al, 1999). Rpn4

intervient dans l'expression constitutive des gènes du protéasome, et son inactivation est létale lorsqu'elle est associée à certains mutants du protéasome (Xie & Varshavsky, 2001). Rpn4 est une protéine à très courte demi-vie dégradée par le protéasome (Xie & Varshavsky, 2001), l'expression du protéasome est augmentée de façon Rpn4-dépendante quand son activité est déficiente, et une forme « stable » de Rpn4 entraîne une augmentation de l'expression du protéasome (Ju et al, 2004). Ces résultats ont conduit à un modèle de régulation de l'homéostasie du protéasome par une boucle de rétrocontrôle négatif où Rpn4 active les gènes du protéasome puis est dégradée par les protéasomes eux-mêmes – ou comment mordre la main qui vous nourrit... Deux voies de dégradation par le protéasome existent pour Rpn4, la première, apparemment majoritaire, ubiquitine-indépendante (Xie & Varshavsky, 2001), la seconde ubiquitine-dépendante (Ju & Xie, 2004; Wang et al, 2004; Ju & Xie, 2006).

Le gène *RPN4* est également la cible d'un contrôle transcriptionnel complexe incluant la réponse à différents stress pouvant nécessiter, ou non, une augmentation d'activité protéolytique (Owsianik et al, 2002; Hahn et al, 2006). Enfin, en plus du protéasome, le motif PACE est présent dans le promoteur de plus d'une vingtaine de gènes, codant notamment des facteurs associés au protéasome (comme Ecm29 et Rpn4 lui-même) ou des protéines impliquées dans l'ubiquitinylation, mais également des protéines du métabolisme de l'ARN ou de la fonction vacuolaire (Mannhaupt et al, 1999; London et al, 2004). Il est donc possible que la régulation du protéasome ne soit qu'une facette des réponses cellulaires contrôlées par Rpn4. Pour l'heure, aucun homologue de Rpn4 ou motifs PACE n'ont été identifiés chez les eucaryotes supérieurs, mais l'augmentation de l'expression des sous-unités du protéasome en réponse à son inhibition par des traitements chimiques ou par interférence ARN a été décrite chez les métazoaires (Lundgren et al, 2003; Meiners et al, 2003). AIRAP (Arsenite-Inducible RNA-Associated Protein), une protéine induite par un traitement à l'arsenite ou au MMS qui s'associe avec la base du 19S et modifie l'activité du protéasome (Stanhill et al, 2006) pourrait faire figure de (très) hypothétique homologue fonctionnel de Rpn4 chez les mammifères.

3.6 Mécanistique de la dégradation des substrats du protéasome

Après avoir présenté les 2 sous-complexes du protéasome 26S et leur assemblage, nous détaillerons chacune des étapes permettant la dégradation des substrats polyubiquitylés, à savoir (i) l'activation du 20S par le 19S, (ii) la reconnaissance du substrat polyubiquitylé, (iii) le dépliement du substrat et sa translocation vers la chambre protéolytique du 20S, (iv) la déubiquitylation du substrat et enfin (v) la dégradation du substrat (**figure I 31**). Nous verrons également que de nombreuses protéines associées au protéasome interviennent dans ces différentes fonctions.

3.6.1 Dégradation ATP-dépendante

La dépendance vis à vis de l'ATP du système de dégradation des protéines intracellulaires qui deviendra le système ubiquitine-protéasome a servi tout autant de motivation que de guide au cours de sa découverte. Chez les eucaryotes, l'ATP est indispensable à la fois pour la conjugaison de l'ubiquitine au substrat et pour sa dégradation par le protéasome 26S (Voges et al, 1999; Smith et al, 2006). Alors qu'il n'est requis que pour la première étape de la réaction d'ubiquitinylation (voir paragraphe 2.2.1), l'ATP joue de multiples rôles dans la fonction du protéasome, et semble même intervenir dans la quasi-totalité des étapes menant à

la protéolyse (voir ci-dessous). L'ATP-dépendance recouvre 2 notions, qu'il conviendra de distinguer : d'une part la nécessité d'une liaison à l'ATP, d'autre part le besoin de l'énergie d'hydrolyse de l'ATP. Expérimentalement, l'utilisation d'analogues non-hydrolysables de l'ATP (ATP γ S ou AMP-PNP) permet une telle discrimination.

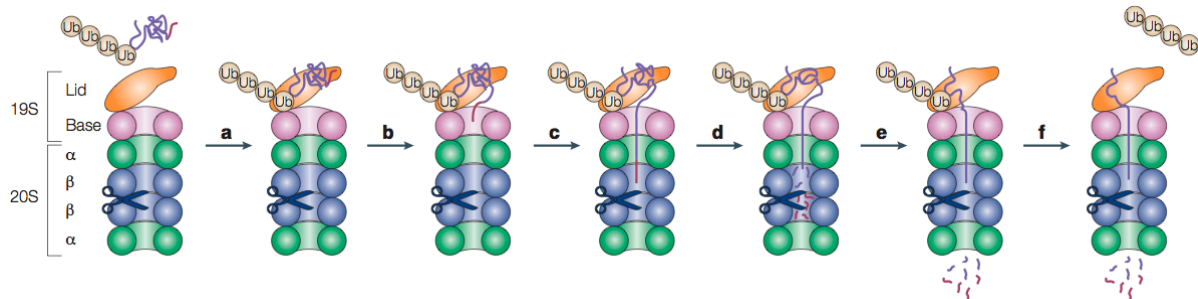


Figure I 31. Etapes de la dégradation des substrats polyubiquitinylés par le protéasome 26S. Extrait de (Pickart & Cohen, 2004)

L'association 19S-20S permet d'ouvrir le pore axial du protéasome 20S. Le complexe régulateur 19S, associé à des protéines accessoires du protéasome (non-représentées) assure la reconnaissance des substrats liés à une chaîne de polyubiquitine (a). Le 19S permet alors le dépliement du substrat (b) et sa translocation (c) vers la chambre protéolytique du 20S (d) où il est hydrolysé en oligopeptides (e). Le substrat est déubiquitinylé au cours du processus de dégradation avant l'entrée dans la chambre catalytique (f).

3.6.2 Activation du protéasome 20S

3.6.2.1 Fermeture du pore axial du protéasome 20S

Le protéasome 20S eucaryote isolé est catalytiquement quasi inerte. Son activation, c'est à dire sa capacité à dégrader des peptides et des protéines dépliées, requiert dans l'immense majorité des cas l'association avec un complexe régulateur. Cet état « auto-inhibé » est lié à l'obstruction physique des pores axiaux conduisant à la chambre protéolytique par la projection des queues N-terminales (en amont des hélices H0) des sous-unités α (Groll et al, 1997). La sous-unité α_3 semble particulièrement importante dans la formation de cette « porte » fermant le pore du 20S : sa queue N-terminale s'étend en travers du pore du CP et interagit avec les extensions N-terminales de l'ensemble des autres α formant l'occlusion. Chez *S. cerevisiae*, la délétion des 9 acides aminés N-terminaux d' α_3 ($\alpha_3\Delta N$) provoque une désorganisation structurale majeure et « ouvre » le canal vers la chambre catalytique, dérégulant l'activité peptidase du 20S (Groll et al, 2000). Les contacts directs formés entre les sous-unités α adjacentes impliquent les résidus d'un motif YDR (Tyr8-Asp9-Arg10) conservé au sein des extensions N-terminales des α . Ce motif joue un rôle essentiel dans la stabilisation de l'état fermé du canal (Groll et al, 2000; Forster et al, 2003; Smith et al, 2006).

3.6.2.2 Mécanisme d'ouverture du protéasome 20S

L'activité peptidase de 20S $\alpha_3\Delta N$ purifiés est similaire à celle des protéasomes 26S purifiés à partir de la souche mutante ou d'une souche sauvage. Ainsi, la formation du protéasome 26S active le CP d'une façon comparable à la délétion de la queue N-terminale d' α_3 , ce qui indique que la dérégulation du 20S par le 19S implique l'ouverture de la « porte » du pore formée par les queues N-terminales des α (Groll et al, 2000). Afin de mieux comprendre le mécanisme sous-jacent, des modèles d'activation plus simples ont été étudiés.

3.6.2.2.1 Ouverture du protéasome 20S par PA28

Chez certains eucaryotes, l'activité peptidase du 20S est fortement stimulée par le complexe régulateur PA28 (voir paragraphe 3.3.4). Un modèle d'ouverture du pore du CP par PA26, l'homologue trypanosome de PA28, a été proposé. L'association du complexe heptamérique PA26 avec le 20S requiert les extrémités C-terminales des sous-unités de PA26 (Ma et al, 1993) et l'étude par cristallographie de la structure d'un protéasome chimère composé de PA26 de *Trypanosoma brucei* et du 20S de *S. cerevisiae* a montré que ces extrémités se fixent dans de petites « poches » entre les sous-unités α adjacentes (Whitby et al, 2000). Ces interactions sont suffisantes pour la liaison PA26/20S mais pas pour l'activation du protéasome (Zhang et al, 1998). Les sous-unités de PA26 contiennent chacune un deuxième domaine dit domaine d'activation qui interagit avec les résidus N-terminaux des sous-unités α et, ce faisant, induit un changement de structure faisant passer la « porte » du pore d'une conformation asymétrique fermée à une conformation symétrique ouverte (Whitby et al, 2000; Forster et al, 2003). D'autres ont proposé que le mécanisme d'ouverture du 20S par le 19S soit similaire (Forster et al, 2005). Cependant, une différence fondamentale entre PA28/26 et le 19S sème le doute : PA28/26 a une structure heptamérique, qui lui permet d'imposer sa symétrie d'ordre 7 à l'anneau α du 20S, un processus fondamental dans son activation (Whitby et al, 2000; Forster et al, 2003). La structure hexamérique des Rpt de la base de la RP semble difficilement conciliable avec un tel mécanisme.

3.6.2.2.2 Ouverture du protéasome 20S par le 19S

De nombreuses réponses sur l'activation du 20S eucaryote par le 19S ont été fournies par l'étude du complexe ATPase PAN (Proteasome-activated nucleotidase) de l'archéobactérie *M. jannaschii* (**figure I 32**). PAN forme un anneau hexamérique constitué de 6 sous-unités AAA ATPases PAN identiques (Zwickl et al, 1999). PAN est l'homologue connu le plus proche des ATPases eucaryotes du 19S, partageant plus de 40% d'identité de séquence avec les 6 Rpt (Smith et al, 2006).

Smith *et al.* ont montré que PAN et trois des 6 Rpt (Rpt2, Rpt3 et Rpt5) contiennent un motif C-terminal conservé de 3 résidus HbYX (acide aminé hydrophobe-tyrosine-acide aminé X) (Smith et al, 2007). Ces résidus sont essentiels à l'association de PAN avec le 20S archéobactérien et à l'ouverture du pore axial : une fois l'ATP lié par les ATPases, ils interagissent avec des « poches » situées entre les sous-unités α adjacentes (probablement les mêmes que pour PA26) et déclenchent l'ouverture de la porte obstruant le pore axial du 20S. Des polypeptides correspondant à la queue C-terminale de PAN comprenant le motif HbXY se lient au 20S et sont suffisants pour l'activer *in vitro*. Un système clé/serrure apparemment conservé chez les eucaryotes (**figure I 33**) : des peptides issus de la queue C-terminale de PAN, de Rpt2 ou de Rpt5 induisent l'ouverture du 20S mammifère *in vitro* ; de plus, la mutation chez *S. cerevisiae* du résidu tyrosine du motif HbYX de Rpt2, Rpt3 ou Rpt5 inhibe l'ouverture du 20S (alors qu'elle ne semble pas affecter l'interaction 19S-20S). La mutation ou la délétion des résidus C-terminaux de chaque Rpt du 19S entraîne par ailleurs des altérations spécifiques du protéasome : la mutation de la tyrosine C-terminale de Rpt1 (qui ne fait pas partie d'un motif HbYX) perturbe ainsi très fortement la stabilité du 26S. L'ensemble de ces résultats pointe à nouveau vers un rôle distinct de chaque Rpt, de mieux en mieux caractérisé (Smith et al, 2007).

Des travaux réalisés par le même laboratoire ont montré que l'interaction des résidus C-terminaux de PAN avec des résidus spécifiques au sein des poches inter- α entraîne la rotation des sous-unités α et le déplacement d'une boucle en dehors du pore, ce qui stabilise la conformation « ouverte » de la porte (Rabl et al, 2008). Cette conformation ouverte semble être similaire à celle induite par PA26 (Forster et al, 2005). 2 mécanismes distincts mais un état final similaire.

L'interaction double-hybride des sous-unités Rpt du 19S avec plusieurs sous-unités α pourrait trouver dans le système clé/serrure d'ouverture du 20S sa justification (voir paragraphe 3.3.4.2.4). Cependant, il est évident que les 6 extrémités C-terminales de PAN/des Rpt ne peuvent pas contacter simultanément les 7 poches inter- α . La seule solution est que l'activation du 20S ne requiert la liaison que d'un sous-ensemble des queues C-terminales au sein des interstices entre les sous-unités α (rappelons que le motif HbXY n'est présent que dans 3 Rpt). Une association asymétrique flexible en accord avec les observations par microscopie électronique suggérant une certaine mobilité du 19S par rapport au 20S (Walz et al, 1998) (voir paragraphe 3.3.4.1). Comme d'autres membres de la famille des AAA ATPases, PAN et les Rpt subissent des changements conformationnels majeurs ATP-dépendants indissociables de leur activité de dépliement et de translocation du substrat (Smith et al, 2007). Le mécanisme clé/serrure et l'association flexible du 19S avec le 20S apparaissent ainsi particulièrement adaptés au fonctionnement hautement dynamique de ces complexes ATPasiques.

Enfin, il a été suggéré très récemment que les sous-unités non-ATPasiques de la base Rpn1 et Rpn2 participent à l'ouverture du 20S (Rosenzweig et al, 2008).

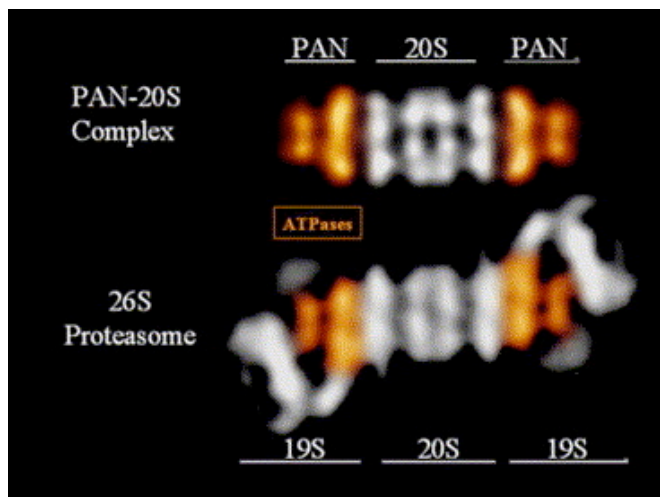


Figure I 32. Comparaison des images par microscopie électronique des complexes PAN-protéasome 20S de *M. jannaschii* et protéasome 26S de *Xenopus laevis*. Extrait de (Smith et al, 2006)

Le complexe PAN et les 6 Rpt du 19S eucaryote sont colorés en orange.

3.6.2.2.3 Couplage assemblage/ouverture ?

Un dernier point mérite d'être soulevé : contrairement au complexe PA26-20S pour lequel les étapes d'association et d'activation sont clairement séparables, l'association de PAN avec le 20S et son activation semblent intrinsèquement liées (Smith et al, 2005; Smith et al, 2007). D'autres travaux ont montré que l'association 19S-20S et l'activation du 26S eucaryote sont temporellement inséparables, mais plusieurs résultats suggèrent un découplage : la mutation du résidu tyrosine du motif HbYX de Rpt2, Rpt3 ou Rpt5 chez *S. cerevisiae* inhibe l'ouverture du 20S mais ne semble pas affecter l'interaction 19S-20S (Smith et al, 2007) ; la vitesse de désassemblage en absence d'ATP est plus lente que la perte d'activité

protéolytique, et l'ATP peut stimuler l'activité de protéasomes 26S déjà assemblés (Liu et al, 2006). Il est ainsi possible que la liaison de l'ATP à certains domaines ATPasiques soit suffisante pour l'assemblage du 26S, et que la liaison de l'ATP à d'autres domaines soit plus particulièrement impliquée dans l'activation (Liu et al, 2006). Il était connu chez la levure qu'une mutation au sein du domaine de liaison à l'ATP de Rpt2 (*rpt2RF*) entraîne une perte d'activité peptidase du 26S (Rubin et al, 1998). Kölher *et al.* ont montré que le mutant *rpt2RF* est sauvé par la mutation $\alpha 3\Delta N$ qui entraîne l'ouverture constitutive du 20S (Köhler et al, 2001). La liaison de l'ATP au domaine ATPase de Rpt2 semble donc jouer un rôle spécifique dans l'ouverture du 20S, probablement en favorisant l'insertion de la queue C-terminale de Rpt2 au sein des poches inter- α .

Chez les eucaryotes, l'association du couvercle avec la base stabilise l'interaction de la base avec le 20S (voir paragraphe 3.5.2.4.3). On peut envisager que l'interaction du couvercle avec la base entraîne des changements de conformation des sous-unités Rpt favorisant l'exposition de leurs extrémités C-terminales et/ou leur insertion dans les poches inter- α .

3.6.2.2.4 Autres mécanismes d'ouverture du protéasome 20S

En plus des complexes régulateurs 19S, PA28 et PA200, les protéasomes 20S eucaryotes peuvent être directement activés par traitement chimique avec de faibles concentrations de détergent SDS (Sodium dodécylsulfate) (Groll et al, 2000), ainsi que par certains peptides hydrophobes – cette ouverture du pore du 20S pourrait correspondre *in vivo* à un mécanisme facilitant la sortie des produits de clivage du protéasome (Kisselev et al, 2002). Enfin, des protéines intrinsèquement déstructurées (p21^{cip}, caséine, α -synucléine), correspondant à des substrats physiologiques non-ubiquitinylés du protéasome, peuvent également activer le 20S : *in vitro*, ces protéines sont efficacement dégradées par le protéasome 20S « latent » alors qu'il est (presque) incapable d'hydrolyser des petits peptides. Elles possèdent donc certaines caractéristiques leur permettant d'ouvrir le pore du 20S contrôlant l'accès à la chambre protéolytique (Liu et al, 2003). Ce mécanisme suggère des rôles protéolytiques propres au 20S présent sous forme libre *in vivo*. La dégradation des protéines oxydées par le 20S en est l'illustration (pour une revue, (Davies, 2001)).

3.6.3 Reconnaissance du substrat polyubiquitinylé

Les études réalisées sur des substrats modèles ont montré qu'une chaîne comportant au moins 4 molécules d'ubiquitine reliées par la lysine K48 est nécessaire pour se lier au protéasome avec une forte affinité (Thrower et al, 2000). De nombreux substrats ciblés pour la dégradation ont des chaînes beaucoup plus longues ; au contraire, certains substrats monoubiquitinylés sont également reconnus (voir paragraphe 3.6.3.1.3). La reconnaissance du signal ubiquitine protéolytique par le protéasome étant le prérequis indispensable à la dégradation des substrats de l'UPS, les récepteurs assurant ce processus ont été activement recherchés.

3.6.3.1 Récepteurs intrinsèques

3.6.3.1.1 Rpn10/S5a

La sous-unité S5a/Rpn10 du 19S a été la première protéine se liant à l'ubiquitine identifiée (Deveraux et al, 1994). Rpn10 contient dans sa partie C-terminale un motif UIM d'interaction

avec l'ubiquitine (Ubiquitin Interacting Motif), membre fondateur de la sous-famille des domaines UBD (Ubiquitin Binding Domain) du même nom (Fu et al, 1998b; Hofmann & Falquet, 2001)¹¹.

La partie N-terminale de Rpn10 définit un domaine VWA (un motif structural identifié dans le facteur de von Willebrand) impliqué dans l'interaction avec la RP (Glickman et al, 1998a; Fu et al, 2001). La protéine Rpn10/S5a isolée est capable de lier des chaînes d'ubiquitine avec une forte affinité (Deveraux et al, 1994), et est donc logiquement apparue comme un facteur de reconnaissance par le 26S des substrats polyubiquitinylés, un rôle confirmé par la suite par plusieurs études biochimiques (Pickart & Cohen, 2004). Rpn10/S5a était même considérée à l'époque de sa découverte comme l'unique récepteur de l'ubiquitine dans la cellule. Cependant, contre toute attente, l'inactivation de *RPN10* chez *S. cerevisiae* n'affecte que très modérément la protéolyse et la viabilité cellulaire, ce qui indique l'existence d'autres facteurs de reconnaissance des protéines polyubiquitinylées partageant, au moins en partie, les fonctions de Rpn10 (van Nocker et al, 1996).

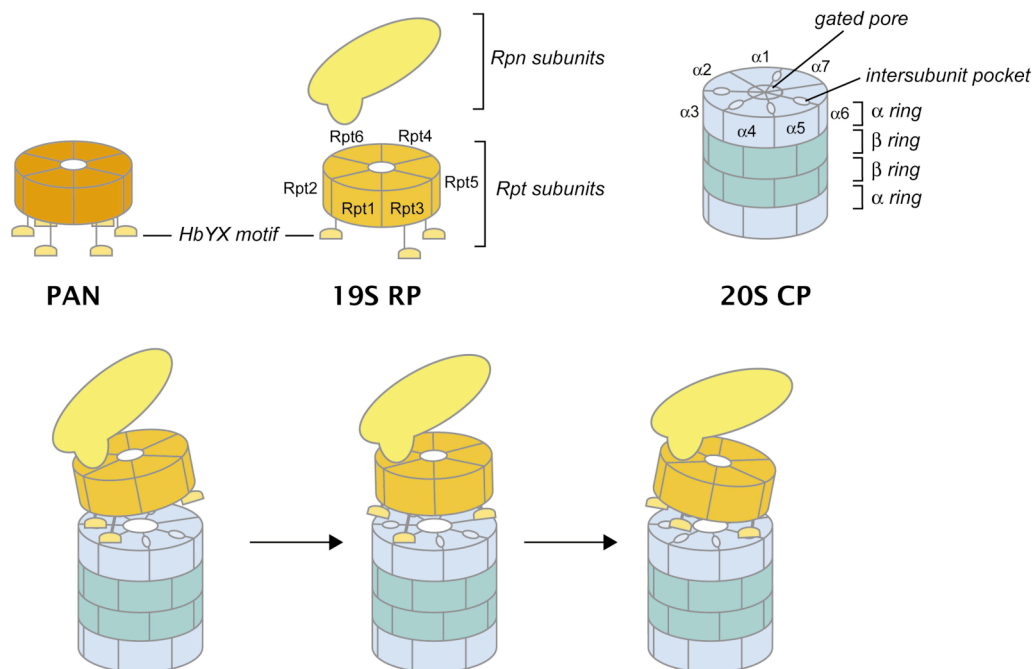


Figure I 33. Modèle d'ouverture du protéasome 20S par le complexe régulateur 19S. Extrait de (Saeki & Tanaka, 2007)

La sous-unité PAN du complexe ATPase du protéasome de *M. jannaschii* et trois des 6 Rpt du 19S (Rpt2, Rpt3 et Rpt5) contiennent un motif C-terminal conservé de 3 résidus HbYX. Après liaison de l'ATP par les ATPases, ces extrémités C-terminales se lient au niveau d'interstices situés entre les sous-unités α adjacentes du 20S et déclenchent l'ouverture de la porte obstruant le pore axial du 20S. L'activation du 20S ne requiert probablement la liaison que d'un sous-ensemble des queues C-terminales des Rpt au sein des poches inter- α .

Le rôle de Rpn10 apparaît en fait assez complexe. Rpn10 est la seule sous-unité du 19S retrouvée en quantités importantes sous une forme non associée au protéasome (van Nocker et al, 1996), et la surexpression de Mbp1, l'homologue de Rpn10 chez la plante *Arabidopsis thaliana*, inhibe la dégradation des protéines polyubiquitinylées *in vitro*, les formes libres de

¹¹ Depuis, de nombreux autres domaines UBD ont été découverts, les protéines à UBD servant de récepteurs, d'« interprètes » du signal ubiquitine (pour une revue sur les protéines à UBD, (Hicke et al, 2005).

Mbp1 séquestrant probablement les substrats du protéasome (Deveraux et al, 1995b). De plus, le domaine de liaison à l'ubiquitine de Rpn10/S5a pourrait être masqué quand cette sous-unité se trouve incorporée au sein des protéasomes (Lam et al, 2002).

L'ensemble de ces résultats suggèrent un rôle de « navette » de Rpn10 afin d'amener les substrats polyubiquitylés au protéasome plutôt qu'un rôle de récepteur « résident ».

3.6.3.1.2 Rpt5

La recherche d'un site de reconnaissance des chaînes d'ubiquitine au sein du 19S a identifié un deuxième récepteur intrinsèque potentiel, la sous-unité ATPasique Rpt5/S6', qui peut être spécifiquement pontée à un tétramère d'ubiquitine (Lam et al, 2002). Les sous-unités ATPases des complexes régulateurs eubactériens et archéobactériens sont aussi impliquées dans la reconnaissance directe de leurs substrats, en se liant en général à un court motif (un signal de dégradation) au sein de la chaîne polypeptidique (Voges et al, 1999). La diversification de ces sous-unités au cours de l'évolution (Rubin et al, 1998; Kohler et al, 2001) aurait ainsi pu s'accompagner de la spécialisation d'une ATPase dans la liaison du signal protéolytique eucaryote, l'ubiquitine (même si le motif d'interaction de Rpt5 avec l'ubiquitine reste à identifier). Un rôle général pour la base de la RP dans la reconnaissance du substrat permettrait son positionnement adéquat pour les étapes suivantes de dépliement puis de translocation, également réalisées par la base (Lam et al, 2002). Il est ainsi probable que Rpt5 ne fonctionne pas en parallèle de Rpn10 ou d'autres récepteurs de l'ubiquitine, mais plutôt en aval (Verma et al, 2004).

3.6.3.1.3 Rpn13

Très récemment, une autre sous-unité du 19S, Rpn13, a été caractérisée comme un récepteur intrinsèque du protéasome à l'ubiquitine (Husnjak et al, 2008; Schreiner et al, 2008). Rpn13 lie avec une forte affinité des tétramères d'ubiquitine, mais également des monomères ou des dimères d'ubiquitine, *via* son domaine Pru (Pleckstrin-like receptor for ubiquitin) N-terminal, un nouveau domaine de reconnaissance de l'ubiquitine. Bien que de manière générale la conjugaison d'au moins 4 ubiquitines soit nécessaire à la dégradation d'une protéine (Thrower et al, 2000), certaines observations ont montré que des substrats monoubiquitylés peuvent également être ciblés au protéasome (Boutet et al, 2007). La reconnaissance de ces substrats pourrait dépendre tout particulièrement de Rpn13 (même si le récepteur « classique » S5a/Rpn10 peut aussi lier une protéine monoubiquitylée (Boutet et al, 2007)). Rpn13 se lie à Rpn2 *via* son domaine Pru mais il a été montré que Rpn13 peut interagir simultanément avec l'ubiquitine et le protéasome (Husnjak et al, 2008; Schreiner et al, 2008). La délétion de *RPN13* chez *S. cerevisiae*, comme celle de *RPN10*, est viable, mais un (léger) phénotype synthétique de sensibilité à la canavanine apparaît quand des mutations spécifiques des sites de liaison à l'ubiquitine de Rpn10 et Rpn13 sont combinées, indiquant une certaine redondance fonctionnelle entre ces 2 récepteurs de l'ubiquitine (Husnjak et al, 2008).

3.6.3.2 Récepteurs extrinsèques

L'inventaire des sous-unités du protéasome a été réalisé essentiellement à partir de complexes isolés par des méthodes biochimiques « classiques ». Des méthodes plus douces de purification par affinité couplées à la spectrométrie de masse ont permis l'identification de nombreuses protéines associées au protéasome qui, même si elles ne sont pas stoéchiométriques, participent à sa fonction. En parallèle, plusieurs études basées, entre

autres, sur des cribles double-hybride ont aussi révélé de multiples facteurs interagissant avec le protéasome. Même s'il est parfois difficile de distinguer les protéines régulatrices des substrats, il est clair désormais que ces facteurs « accessoires » jouent un rôle majeur dans l'activité du protéasome. Parmi eux, plusieurs protéines apparaissent comme de bons candidats pour servir de récepteurs des substrats polyubiquitylés. Ces protéines sont caractérisées par deux domaines : un domaine amino-terminal UBL (Ubiquitin-Like) d'interaction avec le protéasome et un ou plusieurs domaines UBA (Ubiquitin-Associated) de liaison à l'ubiquitine (Elsasser & Finley, 2005). Une organisation similaire à celle de Rpn10 avec ses domaines VWA et UIM, et qui permettrait d'escorter les substrats ubiquitylés jusqu'au protéasome. Ce rôle a été confirmé par de nombreuses études (Elsasser & Finley, 2005), notamment celles de Verma *et al.* qui ont démontré chez *S. cerevisiae* que la dégradation de Sic1 par le protéasome dépend d'une protéine UBA-UBL spécifique, Rad23, à la fois *in vitro* et *in vivo* (Verma et al, 2004). Ces travaux ont également montré que Rad23 et Rpn10 contribuent toutes deux au turnover de Sic1 *in vivo*, ce qui est en accord avec le défaut synthétique de croissance observé en combinant la délétion de *RAD23* avec un mutant *rpn10* dépourvu de domaine UIM (Verma et al, 2004).

Le protéasome peut ainsi reconnaître ses substrats à la fois *via* des récepteurs intrinsèques (Rpn10, Rpn13 et Rpt5) et des récepteurs extrinsèques qui s'associent de façon réversible avec le protéasome. 3 protéines UBA-UBL sont connues chez *S. cerevisiae*, Rad23, Dsk2 et Ddi1, qui définissent, avec leurs homologues mammifères, 3 grandes familles d'adaptateurs du substrat pour le protéasome (**figure I 34**). L'interaction de Rad23, Dsk2 et Ddi1 avec le protéasome est médiée par la sous-unité de la base du 19S Rpn1 qui est capable de lier le domaine UBL (Elsasser et al, 2002; Saeki et al, 2002). L'homologue mammifère de Rpn10, S5a, contient un deuxième motif UIM pouvant interagir avec le domaine UBL des récepteurs de l'ubiquitine hHR23a (Hiyama et al, 1999) et hPliC2 (Walters et al, 2002). Le domaine Pru de hRpn13 est également capable de se lier à ces 2 protéines *via* leur UBL (Husnjak et al, 2008). S5a/Rpn10 et hRpn13 pourraient ainsi recruter indirectement des substrats au protéasome *via* les protéines UBA/UBL. Alternativement, un même substrat pourrait être reconnu de manière coordonnée par plusieurs récepteurs.

3.6.3.3 Un niveau de régulation supplémentaire

Une question importante est de comprendre pourquoi un signal « universel » comme la chaîne de polyubiquitine demande plusieurs récepteurs pour le protéasome. Une réponse a été apportée par Verma *et al.*, qui ont montré que la stabilité de plusieurs substrats est affectée différemment selon le récepteur inactivé (Verma et al, 2004). Les récepteurs des substrats polyubiquitylés du protéasome définissent ainsi un niveau supplémentaire de sélectivité de l'UPS. Différents récepteurs pour différents destins, même si une certaine redondance fonctionnelle existe. Les protéines UBA-UBL pourraient aussi réguler la protéolyse en contrôlant la dynamique ou l'accessibilité de la chaîne d'ubiquitine. Il a ainsi été montré *in vitro* que Rad23 inhibe l'élongation de la chaîne de polyubiquitine (Ortolan et al, 2000) et retarde son désassemblage (Hartmann-Petersen et al, 2003; Raasi & Pickart, 2003). De plus, toujours *in vitro*, Rad23 tout comme Rpn10 inhibent la dégradation d'un substrat par le protéasome, probablement en séquestrant les protéines polyubiquitylées (Deveraux et al, 1995b; Raasi & Pickart, 2003). Les interprétations peuvent rapidement diverger : certains considèrent Rad23/Rpn10 comme un bouclier empêchant le protéasome d'accéder aux substrats ubiquitylés (Pickart & Cohen, 2004), d'autres y voient au contraire un moyen de

favoriser la dégradation en protégeant de la déubiquitinylation (Elsasser & Finley, 2005). Il est possible qu'un équilibre existe *in vivo* et que, outre ajouter à la sélectivité du système UPS, les récepteurs de l'ubiquitine constituent un niveau de régulation à part entière.

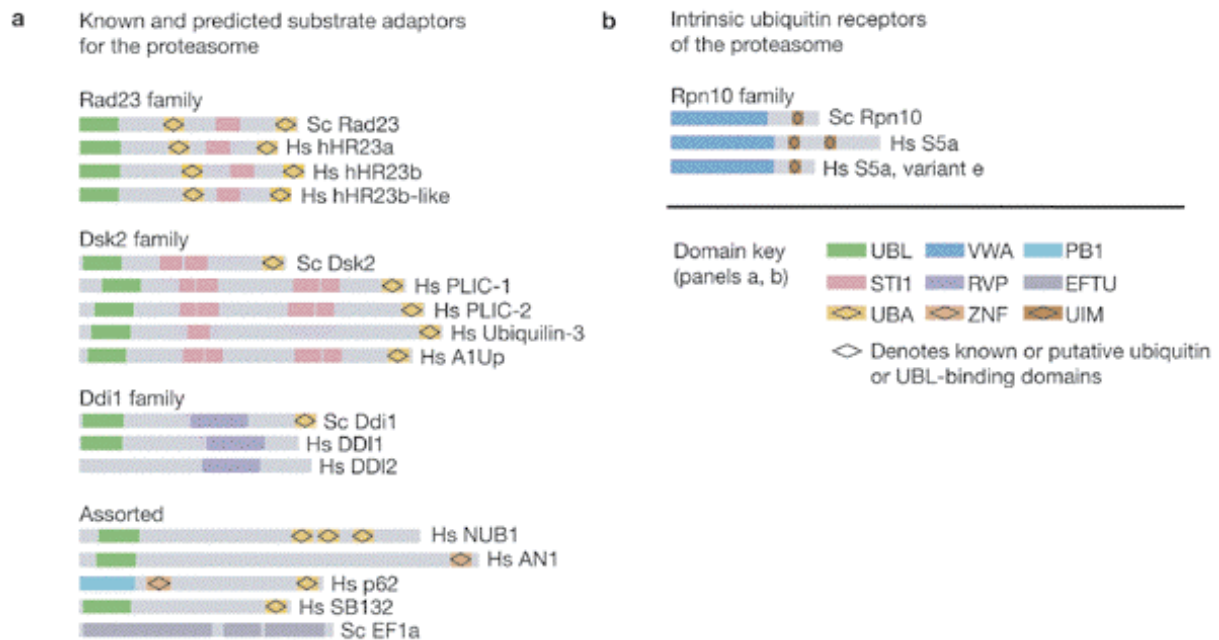


Figure I 34. Récepteurs de l'ubiquitine chez *Saccharomyces cerevisiae* et *Homo sapiens*. Adapté de (Elsasser and Finley, 2005)

Rad23, Dsk2 et Ddi1 définissent, avec leurs homologues mammifères, 3 grandes familles de récepteurs extrinsèques de l'ubiquitine. La protéine Rpn13 n'a été identifiée comme récepteur intrinsèque du protéasome que très récemment, et ne figure donc pas dans ce tableau. Notons enfin que Rpt5, qui fonctionnerait en aval des récepteurs de l'ubiquitine, n'est pas représentée.

3.6.3.4 Autres mécanismes de reconnaissance

Une forme particulière de récepteur de l'ubiquitine pour le protéasome mammifère est constituée par Bag-1, une protéine à domaine UBL qui, de concert avec l'E3 CHIP associée à la protéine chaperonne Hsp70, cible les protéines mal repliées vers le 26S (Cyr et al, 2002). Certains E3 possèdent leur propre domaine UBL permettant leur association au protéasome, telle Parkin, la protéine potentiellement responsable de la forme héréditaire de la maladie de Parkinson juvénile, qui peut se lier à S5a/Rpn10 (Sakata et al, 2003). Récemment, un complexe E3 (KPC) associant une protéine à domaine RING (KPC1) et une protéine UBL-UBA (KPC2) a été identifiée (Kamura et al, 2004). D'autres facteurs semblent coopérer directement avec le protéasome. C'est le cas de l'E3 de levure Ufd4 (Ubiquitine-fusion degradation 4) qui doit interagir avec les sous-unités Rpt4 et Rpt6 de la base de la RP pour permettre la dégradation de son substrat (Xie & Varshavsky, 2002).

Un certain nombre de protéines sont reconnues et dégradées par le protéasome 26S de façon ATP-dépendante sans avoir été préalablement ubiquitinylées (Verma & Deshaies, 2000). L'exemple le mieux caractérisé est celui de la paire formée par l'ornithine décarboxylase (ODC) et l'antizyme 1 (AZ1). AZ1 est un inhibiteur d'ODC et augmente son affinité pour le protéasome. ODC est transloquée dans le 20S alors qu'AZ1 est recyclée, comme l'ubiquitine, pour participer à de nouveaux cycles de destruction d'ODC. *In vitro*, le complexe ODC-AZ1 est capable de concurrencer des protéines polyubiquitinylées pour la liaison au 19S, ce qui

semble indiquer que le(s) récepteur(s) d'ODC-AZ1 au sein du protéasome est le même que celui des chaînes de polyubiquitine. Des résidus spécifiques au sein d'ODC et AZ1 collaborent pour former un signal efficace de reconnaissance par le protéasome 26S, potentiellement en « mimant » des portions de la surface présentée par les chaînes de polyubiquitine (Murakami et al, 1992; Verma & Deshaies, 2000; Zhang et al, 2003). Le cas d'ODC est très différent des protéines intrinsèquement non-structurées mentionnées dans le paragraphe 3.6.2.2.4, capables d'activer directement le protéasome 20S. Qui peut le plus peut le moins, et p21^{cip} ou la caséine, en plus du 20S, peuvent aussi être dégradées par le protéasome 26S de façon ubiquitine-indépendante (Sheaff et al, 2000; Liu et al, 2006). Notons enfin que p21^{cip} existe sous une forme polyubiquitinylée qui est aussi dégradée par le 26S (Sheaff et al, 2000). Un seul substrat, mais plusieurs modes de dégradation par les protéasomes.

3.6.4 Dépliement du substrat

Du fait de l'étroitesse des pores axiaux du protéasome 20S (13Å de diamètre à son point le plus étroit sous forme « ouverte » chez la levure), qui tolèrent au maximum 2 à 3 chaînes polypeptidiques juxtaposées (Groll et al, 2000; Lee et al, 2002), le dépliement du substrat doit précéder sa dégradation. On estime que ce processus est réalisé par la base du complexe 19S, plus précisément par ses ATPases. Plusieurs études ont effectivement montré que la base possède des activités de chaperon : elle empêche l'aggrégation des protéines et favorise le repliement de protéines dénaturées (Braun et al, 1999; Strickland et al, 2000), et le complexe 19S isolé peut déstabiliser la structure d'un substrat polyubiquitinylé (Liu et al, 2002), ces activités nécessitant l'hydrolyse de l'ATP. Cependant, le dépliement d'une protéine globulaire par des protéasomes 26S purifiés, quand bien même est-il indispensable à l'entrée à l'intérieur du 20S, n'a pour l'heure jamais été directement démontré (Smith et al, 2006). Un tel rôle est néanmoins très probable par analogie avec les complexes ATPases des protéases compartimentées archébactériennes, en particulier le complexe PAN. Quand il est associé au protéasome 20S archébactérien en présence d'ATP, PAN stimule la dégradation de protéines dépliées aussi bien que de protéines globulaires stables (Zwickl et al, 1999; Benaroudj & Goldberg, 2000). Le processus de dépliement a été suivi en observant la perte de fluorescence de la GFP, qui est « verte » sous sa forme native. PAN peut catalyser seul le dépliement de la GFP, une activité qui nécessite l'hydrolyse de l'ATP ; en présence du protéasome 20S, PAN permet également la translocation de la GFP dépliée dans le 20S où elle est dégradée (Benaroudj & Goldberg, 2000).

L'activité de type chaperon des ATPases semble être à l'origine des fonctions non-protéolytiques du complexe 19S (voire de la base elle-même) dans plusieurs processus cellulaires incluant la transcription, la réparation de l'ADN et le remodelage de la chromatine (pour une revue, (Collins & Tansey, 2006; Reed & Gillette, 2007).

3.6.5 Translocation du substrat

3.6.5.1 Sur le couplage du dépliement et de la translocation

Le mouvement de la chaîne polypeptidique depuis la base de la RP jusqu'à la chambre catalytique du 20S est évidemment une étape critique de la protéolyse. Il a été proposé que le dépliement et la translocation de la protéine soient des processus couplés où, après l'engagement d'une région peu structurée dans le pore du 20S, les domaines structurés sont

séquentiellement dépliés de façon « mécanique » au fur et à mesure que les ATPases entraînent le substrat à travers le canal du complexe protéase (Lee et al, 2001; Prakash et al, 2004). La stabilité locale de la protéine détermine la quantité d'ATP hydrolysée et en conséquence la vitesse de dépliement et de translocation (Kenniston et al, 2003). Ce mécanisme coopératif est néanmoins remis en cause par certaines observations. Ainsi, alors que l'hydrolyse de l'ATP est nécessaire pour la dégradation d'une protéine globulaire par le complexe 20S-PAN, la dénaturation préalable de cette protéine rend l'hydrolyse de l'ATP dispensable pour sa translocation et sa dégradation (Smith et al, 2005). Une fois dénaturé, la translocation du substrat par PAN peut donc se faire par diffusion passive. De même, il a été montré chez les eucaryotes que le protéasome 26S dégrade des protéines natives intrinsèquement non-structurées (p21^{cip} et la caséine) sans hydrolyse d'ATP, ces substrats atteignant la chambre protéolytique par diffusion passive à travers les pores du 20S ouverts par le 19S (Liu et al, 2006)¹². Ces résultats suggèrent que la translocation (et l'étape de protéolyse) en tant que telle ne nécessite pas l'énergie d'hydrolyse de l'ATP. De plus, il a été montré que le dépliement de la GFP par le complexe PAN peut avoir lieu même en absence de translocation (Navon & Goldberg, 2001; Smith et al, 2005). Il apparaît donc que les processus de dénaturation et de translocation, au moins dans certains cas, sont parfaitement dissociables l'un de l'autre.

Le laboratoire de Goldberg a proposé que la translocation par diffusion passive soit rendue unidirectionnelle par la liaison du substrat aux sites catalytiques du 20S, qui empêche une diffusion rétrograde du polypeptide vers l'extérieur du 20S (Smith et al, 2006).

3.6.5.2 Orientation du substrat lors de la translocation

Un dernier point à éclaircir concerne l'orientation du polypeptide déplié, « linéarisé » lors de sa translocation dans le complexe protéolytique. Les études initiales ont suggéré un mode d'entrée prépondérant *via* une extrémité du polypeptide (Pickart & Cohen, 2004). Par la suite, il est apparu que différents substrats entrent par des extrémités différentes, soit N-terminale, soit C-terminale, ou indifféremment par les 2 (Prakash et al, 2004; Wolf & Hilt, 2004; Smith et al, 2006). Cette orientation semble liée à l'interaction du substrat avec les ATPases, le complexe 20S archébactérien seul ne présentant pas de préférence directionnelle (Navon & Goldberg, 2001).

Des protéines portant des pontages intramoléculaires sont dégradées par le protéasome, ce qui confirme que plusieurs chaînes polypeptidiques juxtaposées peuvent pénétrer dans le pore axial du 20S (Lee et al, 2002) ; de là à imaginer que la dégradation puisse être initiée à partir d'une boucle interne du substrat, il n'y a qu'un pas... franchit par Liu *et al.*, qui ont montré qu'au sein d'un substrat artificiel composé d'un domaine non-replié (la protéine native non-structurée p21^{cip}) entouré de 2 domaines stables (la protéine GFP), le domaine non-structuré est sélectivement dégradé par le protéasome (Liu et al, 2003). Enfin, cette possibilité d'un clivage endoprotéolytique par le protéasome, en lieu et place d'une dégradation totale, a permis d'expliquer certaines réactions inhabituelles de protéolyse partielle catalysées par le protéasome. Ce mécanisme, appelé RUP (Regulated Ubiquitin-Proteasome-dependent processing), est à l'origine de l'activation de plusieurs facteurs de transcription à partir de précurseurs inactifs (pour une revue, (Rape & Jentsch, 2004)). Le cas de la protéine p105,

¹² Comme nous l'avons vu, ces protéines natives non-structurées peuvent également activer directement le 20S (voir paragraphe 3.6.2.2.4).

précurseur de la sous-unité p50 du facteur de transcription NF- κ B1, dont l'extrémité C-terminale est complètement dégradée par le protéasome alors que le domaine N-terminal p50 demeure intact, a été le premier cas décrit et reste l'un des plus célèbres (Hoppe et al, 2000).

3.6.5.3 Signal d'initiation de la protéolyse

La dégradation d'un substrat ne commence donc pas exclusivement à partir d'une extrémité libre. De manière générale, la présence d'une région non-repliée sert de signal d'initiation (Prakash et al, 2004). Chez les bactéries, le motif de dégradation du substrat reconnu par les ATPases semble tenir ce rôle (Voges et al, 1999; Pickart & Cohen, 2004). Chez les eucaryotes, on constate au contraire un découplage entre le site de polyubiquitylation du substrat et le site d'initiation de la dégradation : la direction de la dégradation n'est pas strictement déterminée par la localisation de la chaîne d'ubiquitine, et la dégradation ne commence pas nécessairement au niveau du site d'ubiquitylation (Prakash et al, 2004). De plus, certaines protéines très structurées comme la GFP, même couplées à un tétramère d'ubiquitines, sont réfractaires à la dégradation (Liu et al, 2003). En fait, la chaîne d'ubiquitine est nécessaire mais non suffisante à la dégradation rapide d'une protéine repliée par le protéasome, la présence au sein du substrat d'une région non-structurée augmentant considérablement l'efficacité de sa dégradation (Prakash et al, 2004). En conclusion, la chaîne d'ubiquitine permet la reconnaissance des substrats par le protéasome, mais leur dégradation efficace requiert une région non-structurée additionnelle qui sert de signal d'initiation de la protéolyse (Prakash et al, 2004). L'absence d'une telle région pourrait expliquer la non-dégradation de certaines protéines polyubiquitylées (Thrower et al, 2000). Des signaux contraires d'interruption de la dégradation ont également été identifiés, comme les séquences GRR (Glycine-Rich Repeat) séparant les domaines carboxy- et aminoterminal de p105 (Orion et al, 1995), ou les séquence répétées Glycine-Alanine de la protéine EBNA1 du virus Epstein-Barr qui bloquent sa dégradation par le protéasome, permettant ainsi aux cellules infectées d'échapper au système immunitaire (Dantuma & Masucci, 2002).

3.6.6 Déubiquitylation du substrat

3.6.6.1 Couplage déubiquitylation/dégradation

Une fois reconnu par le protéasome 26S, le substrat polyubiquitylé est déplié et transloqué à travers le pore axial du 20S vers la chambre protéolytique. De façon concomitante, le substrat est déubiquitylé (Pickart & Cohen, 2004). La déubiquitylation des substrats au niveau du protéasome est importante pour plusieurs raisons : le recyclage de l'ubiquitine est nécessaire pour maintenir une concentration suffisante d'ubiquitine libre dans la cellule et donc assurer des taux de protéolyse normaux – de nombreux autres enzymes de déubiquitylation (DUB) non-associés au protéasome y contribuent également (voir ci-dessous). Du point de vue du 26S, le clivage de la chaîne d'ubiquitine avant la dégradation du substrat est un processus essentiel à la dégradation. Seules les protéines dépliées peuvent pénétrer par les pores axiaux du protéasome 20S. Or, un tétramère d'ubiquitine, qui correspond au signal minimal de ciblage au protéasome, a un diamètre d'environ 28Å et bloquerait nécessairement la translocation du substrat en entrant en contact avec le pore dont le diamètre maximal est de 20Å (Groll et al, 2000; Lee et al, 2002). De plus, l'ubiquitine est une protéine très stable (Wintode et al, 1994) et, en conséquence, sa dégradation très lente. Ainsi, un substrat d'ordinaire rapidement protéolysé, lorsqu'il est conjugué à une ubiquitine

mutée au niveau de la glycine 76 empêchant son hydrolyse par les DUB voit son *turnover* diminué d'un facteur 10 (Yao & Cohen, 2002). Cependant, bien que la déubiquitinylation du substrat soit indispensable à sa dégradation, elle ne peut avoir lieu trop précocement, au risque de dissocier et « régénérer » le substrat. Le désassemblage de la chaîne de polyubiquitine doit donc être étroitement couplé à la dégradation. La protéine clé de ce processus est la sous-unité intrinsèque du couvercle de la RP Rpn11 (Verma et al, 2002; Yao & Cohen, 2002). Le domaine MPN de Rpn11 renferme un motif MPN⁺/JAMM correspondant à une activité métalloprotéase à Zn²⁺. La mutation de ce domaine chez la levure entraîne l'accumulation de protéines polyubiquitinylées et la mort cellulaire. *In vitro*, les protéasomes mutants sont incapables de déubiquitinyler leurs substrats, ce qui inhibe la dégradation (Verma et al, 2002; Yao & Cohen, 2002). Rpn11 coupe la liaison isopeptidique entre le substrat et la première ubiquitine et libère des chaînes de polyubiquitine intactes (Yao & Cohen, 2002). Alors que des complexes 19S isolés sont capables de libérer les chaînes d'ubiquitine indépendamment de l'ATP, l'activité de déubiquitinylation de Rpn11 dans le contexte du protéasome 26S requiert son hydrolyse (Yao & Cohen, 2002). Ceci reflète probablement le couplage de l'activité de Rpn11 avec l'activité de dépliement et de translocation des ATPases de la base de la RP afin de synchroniser déubiquitinylation et dégradation en contrôlant l'accès de l'ubiquitine proximale au site actif de Rpn11 (Yao & Cohen, 2002). Un rôle général de l'hydrolyse de l'ATP dans le couplage mécanistique des différents processus nécessaires à la dégradation des protéines polyubiquitinylées a récemment été proposé (Liu et al, 2006). Rpn11 est la seule sous-unité du couvercle possédant une activité catalytique¹³. Le domaine MPN de Rpn8 est très similaire à celui de Rpn11, mais est dépourvu de certains résidus catalytiques. L'activité déubiquitinylase est en fait l'unique fonction connue à ce jour pour le couvercle – mais quelle fonction ! Sa découverte a permis de comprendre, enfin, pourquoi les protéasomes 26S eucaryotes ont un couvercle, de comprendre, enfin, l'intérêt de la structure bipartite de la RP, et de comprendre, enfin, le lien entre le couvercle et l'ubiquitine.

3.6.6.2 Remodelage des chaînes d'ubiquitine

Deux autres déubiquitinases sont associées au protéasome : Ubp6/USP14 et UCH37. Ubp6 s'associe directement à la sous-unité Rpn1 de la base du 19S *via* son domaine UBL N-terminal, ce qui stimule très fortement son activité déubiquitinase ; même si sa stoéchiométrie par rapport au 26S reste toujours à déterminer, Ubp6 est généralement considérée comme un membre à part entière du protéasome (Hanna & Finley, 2007). UCH37 est un composant du 19S chez les métazoaires et la levure fissipare *S. pombe*, mais n'est pas retrouvée chez *S. cerevisiae* (Lam et al, 1997; Pickart & Cohen, 2004). Il a été montré que l'interaction directe d'UCH37 avec hRpn13 stimule son activité isopeptidase (Hamazaki et al, 2006; Qiu et al, 2006). Contrairement à Rpn11, Ubp6 et UCH37 sont des protéases à cystéine active et ne sont pas essentielles ; surtout, elles ne sont pas impliquées dans le couplage déubiquitinylation/dégradation du substrat mais semblent au contraire réguler négativement la protéolyse en enlevant graduellement les ubiquitines du substrat à partir de l'ubiquitine distale de la chaîne – une ubiquitine à la fois pour UCH37 (Lam et al, 1997), une ou plusieurs ubiquitines pour Ubp6 (Hanna et al, 2006). Ce mécanisme de modification (« editing » en

¹³ Rpn11 semble également réguler la structure et la fonction des mitochondries chez *S. cerevisiae*, un rôle probablement indépendant de son activité déubiquitinase (Rinaldi et al, 2008).

anglais) de la chaîne d'ubiquitine pourrait servir de « contrôle qualité » du signal de ciblage au protéasome en assurant que seuls des substrats dont la chaîne est suffisamment longue sont reconnus par le protéasome (Lam et al, 1997). L'interaction d'UCH37 avec hRpn13, un récepteur intrinsèque de l'ubiquitine qui lie avec une forte affinité les protéines mono- ou diubiquitinylées, irait dans ce sens (Husnjak et al, 2008). Un mécanisme encore plus complexe de remodelage des chaînes d'ubiquitine au niveau du protéasome a été proposé chez *S. cerevisiae* (Crosas et al, 2006). Il est assuré par Ubp6 et l'ubiquitine ligase Hul5 (HECT ubiquitin ligase 5), également associée très étroitement au protéasome (*via* Rpn2). Hul5 favorise la dégradation en allongeant les chaînes d'ubiquitine des substrats, jouant ainsi un rôle d'E4, alors qu'Ubp6 a un effet opposé en désassemblant les ubiquitines conjuguées par Hul5. Ces 2 activités antagonistes confèrent au protéasome lui-même un rôle actif de régulation de la spécificité et du devenir de ses substrats.

Récemment, Hanna *et al.* ont montré qu'un mutant catalytique inactif d'Ubp6 conserve sa capacité à inhiber la dégradation protéasome-dépendante *in vitro* et *in vivo*. Ubp6 possède donc à la fois une activité déubiquitinyase et une activité inhibitrice du protéasome. L'action non-catalytique d'Ubp6 consiste à empêcher la déubiquitinylation « en bloc » du substrat par Rpn11, ce qui entraîne un retard de dégradation au cours duquel Ubp6 déubiquitinye progressivement le substrat (Hanna et al, 2006). Le même laboratoire a montré qu'un déficit intracellulaire en ubiquitine provoque l'induction et l'accumulation d'Ubp6. En d'autres termes, un stress ubiquitine modifie la composition du protéasome pour favoriser le recyclage de l'ubiquitine (Hanna et al, 2007). Ubp6 comme interprète majeur d'un dialogue fonctionnel constant entre le protéasome et l'ubiquitine...

Une troisième DUB, Doa4/Ubp4, est associée au protéasome en quantité sous-stoéchiométrique, mais fonctionne probablement majoritairement dans le trafic intracellulaire (Amerik et al, 2000). Il existe en fait plusieurs dizaines d'enzymes de déubiquitinylation chez les eucaryotes, dont la très grande majorité n'est pas associée au protéasome. Elles sont nécessaires au clivage des précurseurs inactifs de l'ubiquitine pour générer l'ubiquitine libre, au désassemblage des chaînes oligomériques libres pouvant interférer avec les substrats polyubiquitinylés pour la liaison au protéasome, et jouent un rôle significatif dans le trafic intracellulaire des protéines membranaires. Des DUB substrats-spécifiques remplissent qui plus est certaines fonctions physiologiques très précises. A noter que des DUB pouvant désassembler des chaînes liées par la lysine 63 ainsi que des protéases agissant sur les UBL ont été identifiées (pour une revue, (Amerik & Hochstrasser, 2004)).

3.6.7 Dégradation du substrat

3.6.7.1 Considérations énergétiques

La dégradation de l'immense majorité des substrats du protéasome 26S est ATP- et ubiquitine-dépendante (bien que des exemples de dégradation ATP-dépendante et ubiquitine-indépendante par le 26S ou encore ATP-indépendante et ubiquitine-indépendante par le 20S existent, comme nous l'avons mentionné). Nous nous sommes efforcés de préciser les relations vis à vis de l'ATP de chaque étape conduisant à l'hydrolyse du substrat. Nous avons ainsi vu que l'association du 19S avec le 20S puis l'activation du 20S demande la liaison de l'ATP ; que le dépliement du substrat nécessite l'hydrolyse de l'ATP ; enfin que la déubiquitinylation du substrat en tant que telle est indépendante de l'ATP, mais que le couplage déubiquitinylation/protéolyse du substrat requiert l'hydrolyse de l'ATP. Concernant

l'étape de protéolyse, l'exemple des protéines intrinsèquement déstructurées est éloquent : l'hydrolyse de l'ATP n'est en effet pas nécessaire à leur dégradation (Smith et al, 2005; Liu et al, 2006). Dans le cas d'un substrat « classique », une fois déplié, son clivage ne requiert pas non plus d'ATP. Ainsi, la dégradation par le protéasome 26S requiert effectivement de l'énergie, mais pas pour l'étape de dégradation proprement dite. Voilà de quoi réconcilier la protéase multicatalytique qu'est le protéasome avec les autres protéases.

3.6.7.2 Vers une protéolyse totale

Une fois le substrat parvenu dans la chambre catalytique du protéasome, l'objectif est clair : la destruction ! Ce qui implique un changement complet de stratégie : contrairement aux événements en amont pour lesquels sélectivité est le maître-mot, l'hydrolyse du substrat est délibérément non-spécifique. 3 sous-unités catalytiques ($\beta 1$, $\beta 2$ et $\beta 5$) et 5 activités enzymatiques différentes (de type caspase, trypsine, chymotrypsine, BrAAP et SNAAP) au sein du 20S eucaryote assurent un très large spectre de clivage. Les 6 sites actifs sont de plus physiquement concentrés au sein d'une chambre protéolytique, ce qui favorise les coupures multiples et récurrentes du substrat. Enfin, il est probable que le dépliement du substrat expose et favorise l'accès aux sites de coupure. Ces caractéristiques combinées permettent la dégradation « processive », rapide et efficace des protéines. Des tests *in vivo* ont ainsi montré que le CP est statistiquement capable de couper après chaque résidu – ou presque (Orlowski & Wilk, 2000).

Les 3 sous-unités β catalytiques eucaryotes sont des protéases à thréonine N-terminale active. Elles diffèrent au niveau d'une poche S1 de reconnaissance du substrat qui détermine leur spécificité de clivage (Groll et al, 2005). Chez les mammifères, suite à la stimulation par l'interféron γ , les sous-unités $\beta 1i$, $\beta 2i$ et $\beta 5i$ sont exprimées et incorporées dans les protéasomes nouvellement synthétisés en lieu et place des sous-unités catalytiques constitutives (Baumeister et al, 1998)¹⁴. Les immunoprotéasomes présentent des propriétés protéolytiques modifiées qui favorisent la production de peptides antigéniques s'associant aux molécules du CMHI (Goldberg et al, 2002). Des substitutions spécifiques d'acides aminés au niveau des poches S1 des sous-unités immunitaires, en particulier pour $\beta 1i$, expliquent la réduction d'activité de clivage de type caspase et l'augmentation parallèle des activités de type chymotrypsine et BrAAP des immunoprotéasomes (Groll et al, 1997). Les oligopeptides générés, issus majoritairement de clivages après des résidus hydrophobes, ont une forte affinité de liaison pour les molécules du CMH de classe I qui interagissent préférentiellement avec des peptides ayant des résidus C-terminaux d'ancrage hydrophobes ou basiques (Engelhard, 1994).

3.6.7.3 Taille des produits de dégradation

La longueur des produits de clivage par le protéasome 26S eucaryote varie de 3 à une vingtaine d'acides aminés, avec une moyenne de 7-8 résidus (Nussbaum et al, 1998; Kisselev et al, 1999b). La structure cristallographique du 20S de *T. acidophilum* a suggéré la présence d'une « règle moléculaire protéolytique » définie par la distance entre les thréonines 1 de 2 sous-unités β adjacentes. D'environ 30Å, cet intervalle permettrait la liaison de peptides de 8 à 12 résidus (Lowe et al, 1995). Une étude réalisée sur des 20S de levure dont seules les sous-

¹⁴ Des protéasomes associant la sous-unité constitutive $\beta 5$ aux sous-unités $\beta 1i$ et $\beta 2i$ ont aussi été décrits (voir paragraphe 3.4).

unités $\beta 5$ sont actives a montré que les produits de clivage obtenus ont une taille similaire à ceux issus d'un protéasome normal – de 8 à 15 acides aminés en moyenne, une taille incompatible avec la distance de 49Å entre les 2 thréonines actives du CP mutant suggérant des produits de clivage de 15 à 18 acides aminés. Seul le profil de clivage est différent, les produits du protéasome mutant étant tous issus de coupures après des acides aminés hydrophobes (Nussbaum et al, 1998). Il semble donc que la longueur des fragments ne soit pas influencée par la distance entre les sites actifs comme postulé pour *T. acidophilum*. Les règles gouvernant la dégradation par le protéasome sont complexes et les produits de clivage peuvent difficilement être déduits à partir des séquences primaires (Holzhutter et al, 1999). Certains acides aminés caractéristiques flanquant le site de clivage guident ainsi la sélection des résidus (dits résidus P1) clivés par les sous-unités catalytiques (Nussbaum et al, 1998). De même, les sous-unités β adjacentes influencent la fonction des 3 sous-unités β catalytiques en contribuant à la structure des poches S1 (Groll et al, 2005). Des expériences menées sur l'autolyse des propeptides des précurseurs des sous-unités β ont montré que le substrat se fixe au niveau de canaux spécifiques définis par la topologie du CP, qui acceptent des peptides de 7-10 résidus. L'affinité du substrat pour ces sites de liaison détermine l'exposition des résidus P1 au niveau de la poche S1 des 3 sous-unités β catalytiques et donc la probabilité de clivage (Groll et al, 1999). Enfin, l'inactivation ou la liaison covalente d'inhibiteurs spécifiques des sites actifs n'entraîne pas de changement structural majeur du CP et n'interfère pas avec l'activité des sites actifs restant (Groll et al, 2005). Il ne semble donc pas exister d'interactions allostériques entre les différents sites catalytiques comme cela avait été proposé (Kisselev et al, 1999a).

3.6.7.4 Sortie des produits de dégradation

Kisselev *et al.* ont suggéré que la capacité des peptides à sortir du protéasome influence également la taille des produits de dégradation (Kisselev et al, 1999b). En effet, la taille moyenne des produits de clivage d'une protéine native déstructurée, la caséine, par une forme « ouverte » du 20S de *S. cerevisiae* (le mutant $\alpha 3\Delta N$) est 40% supérieure à celle générée par un 20S sauvage (Kohler et al, 2001). Ces résultats suggèrent de plus que le canal axial du 20S est la voie majeure de sortie des peptides, même si de petites ouvertures au sein des « murs » du CP pourraient contribuer à ce processus (Groll et al, 1997). L'ouverture du 20S par le 19S est donc importante à la fois pour l'entrée du substrat et la sortie des produits de dégradation. Chez les mammifères, le CP se trouve en excès par rapport à la RP : il y a environ 2 fois plus de CP sous forme libre qu'associé à la RP, et il a été estimé que seuls 15% des CP sont sous la forme RP₂-CP (Tanahashi et al, 2000). Au sein de ces complexes, les 2 RP pourraient établir une « route » pour le substrat – un point d'entrée et un point de sortie, définis selon la RP contactée par le substrat. La présence d'une RP à une seule extrémité du CP (l'autre pore restant sous forme fermée) verrait la sortie des peptides au moins temporairement bloquée par l'entrée d'autres substrats, ce qui augmenterait leur temps de résidence au sein de la chambre catalytique et modifierait la longueur des produits de clivage – un autre mécanisme potentiel de régulation. Il a ainsi été proposé que le complexe activateur PA28 serve de « chasse d'eau » au sein des protéasomes hybrides 19S-20S-PA28 afin de générer des peptides de taille adaptée à la présentation antigénique (Cascio et al, 2002).

En conclusion, le protéasome est beaucoup plus qu'une simple collection de différentes activités protéolytiques, sa structure globale influence la génération des produits de clivage.

La très grande majorité des fragments peptidiques produits par le protéasome sont rapidement dégradés par des endopeptidases et des aminopeptidases en acides aminés, qui pourront être réutilisés pour la biosynthèse de nouvelles protéines (Glickman & Ciechanover, 2002). Chez les mammifères, les peptides destinés à être associés aux molécules du CMH de classe I font exception : ces peptides sont plus stables, probablement grâce à leur prise en charge par les transporteurs TAP (Transporter Associated with Antigen Processing) du réticulum endoplasmique (Rock & Goldberg, 1999).

4. Conclusion

Une quinzaine d'années séparent le modèle de dégradation sélective APF1-dépendant des protéines du système ubiquitine-protéasome (**figure I 12**). Un même intervalle de temps nous sépare désormais du modèle UPS. Sans parler de révolution, notre vision du protéasome et de l'ubiquitine s'est considérablement affinée. En premier lieu est apparu que les 2 composants de l'UPS, naguère indissociables, peuvent exister indépendamment. L'ubiquitine est ainsi devenue une modification post-transcriptionnelle majeure des protéines dont les fonctions vont bien au-delà de la protéolyse. Le protéasome est lui passé du statut de simple « broyeur » à une nanomachine dynamique (*les* protéasomes) et hautement régulée, dont le fonctionnement et l'assemblage sont des processus incroyablement complexes. La dissection du protéasome 26S a notamment révélé un rôle crucial des interfaces entre chacun de ses sous-complexes, à l'origine de la formation *parfaitement* coordonnée d'une structure *parfaitement* fonctionnelle. Nous avons présenté (i) l'interface α/β (l'anneau α sert de plateforme d'assemblage à l'anneau β , dont chaque sous-unité s'incorpore à un position déterminée ; un anneau α correctement orienté $\alpha 1$ - $\alpha 7$ est donc indispensable), (ii) l'interface β/β (les interactions spécifiques entre les anneaux β de 2 hémiprotéasomes permettent de coupler l'activation de la chambre protéolytique à son confinement au sein du 20S dont l'entrée est fermée par les queues N-terminales des sous-unités α), (iii) l'interface α /base (la liaison des extrémités C-terminales de sous-unités ATPases de la base du 19S au sein des interstices entre les sous-unités α ouvre, tel un système clé-serrure, le protéasome 20S), et (iv) l'interface base/couvercle (l'interaction entre la base et le couvercle renforce l'association base-20S). Outre les propriétés intrinsèques des sous-unités du protéasome (caractéristiques structurales, présence de propeptides pour certaines sous-unités β), plusieurs protéines chaperonnes participent à la mise en place et au maintien d'interfaces compétentes pour les étapes ultérieures d'assemblage – tout du moins pour le protéasome 20S. L'hétérodimère PAC1-PAC2 sert de plateforme d'assemblage pour l'anneau α tout en limitant la formation de dimères illégitimes et improductifs d'anneaux α (on pourrait ainsi rajouter l'interface α/α comme cible d'une régulation spécifique) ; Ump1 intervient au niveau de l'interface β/β et coordonne l'association de 2 hémiprotéasomes avec le clivage des propeptides des sous-unités β . Compte tenu de sa complexité, il ne serait pas autrement surprenant que d'autres protéines soient impliquées dans l'assemblage d'une structure telle que le protéasome 26S. Intervenant au niveau des interfaces anneau α /base et base/couvercle, notamment. La formation du protéasome 20S n'a sûrement pas non plus livré tous ses secrets. Dont acte.

RESULTATS ET DISCUSSION

1^{ère} partie : Réalisation d'un crible à l'échelle du génome chez *Saccharomyces cerevisiae* pour identifier de nouveaux partenaires de Rad53

L'objectif du laboratoire est d'identifier et de caractériser les régulateurs de Rad53 ainsi que ses cibles chez l'organisme modèle *S. cerevisiae*, puis d'étudier si ces résultats sont transposables à hChk2 dans les cellules humaines. Fondamentalement, deux approches sont possibles, consistant à rechercher soit les interactions physiques de la protéine Rad53, soit les interactions génétiques de mutants du gène *RAD53*. La première stratégie a fait l'objet d'un crible double-hybride réalisé par le Dr W. Aucher au sein du laboratoire. L'approche génétique a été adoptée au cours de ma thèse.

1. Approche génétique

1.1 Introduction

L'utilisation d'allèles perte ou gain de fonction d'un gène est souvent la première source d'information sur le rôle de la protéine qu'il code. L'analyse fonctionnelle classique pour répondre à la question « A quoi sert la protéine X ? » consiste à inactiver le gène *X* et à rechercher si l'absence de *X* entraîne l'apparition d'un phénotype, c'est à dire d'un comportement différent du comportement « sauvage » en réponse à un stress. Chez la levure *S. cerevisiae*, suite au séquençage complet du génome, un consortium international (Saccharomyces Genome Deletion Project, www.yeastdeletion.stanford.edu) a ainsi entrepris d'inactiver toutes les ORF identifiées afin de leur assigner une fonction découlant des phénotypes observés.

Un degré supérieur d'analyse consiste à combiner les allèles perte ou gain de fonction de différents gènes, afin de déterminer dans quelle mesure la fonction d'un gène dépend de la présence d'un autre gène. Ainsi, grâce aux interactions génétiques – on parle aussi de relations d'épistasie – il est possible de disséquer les relations fonctionnelles entre les gènes. De telles analyses ont permis de classer de nombreux gènes au sein de groupes d'épistasie dont les membres participent à une fonction commune, et d'y préciser leur place. Elles sont même parfois suffisantes pour démontrer l'existence d'un complexe protéique, au même titre que la détection d'interactions physiques entre ses différents membres. A l'heure des cribles à haut débit, une étude récente (Collins et al, 2007) a ainsi mis en lumière l'indispensable complémentarité d'une analyse des interactions génétiques à l'échelle du génome avec les cartes globales d'interactions physiques, afin d'élaborer *in fine* un « interactome » fonctionnel.

Les checkpoints de l'ADN correspondent à une voie d'épistasie de type « régulation positive » : le produit du gène amont active le produit du gène aval (ainsi, Mec1 est nécessaire à l'activation de Rad53, qui est lui-même nécessaire à l'activation des protéines effectrices de la réponse aux dommages de l'ADN). Cette information est un prérequis indispensable qui conditionne l'approche génétique à envisager pour identifier de nouveaux partenaires de Rad53. Le type de partenaire recherché (régulateurs positifs, régulateurs négatifs, substrats...) imposera ainsi l'utilisation d'allèles perte ou gain de fonction de *RAD53*. En pratique, il faut tout d'abord disposer de mutants de *RAD53* qui confèrent un phénotype clairement identifiable et dont les modifications seront aisément « criblables » (absence/rétablissement de la croissance par exemple). Une fois l'appât prêt, il reste à définir ce que l'on se propose de

cribler. Chez la levure, des années de biologie moléculaire et de génétique offrent un vaste choix (collections de mutants, de banques d'ADN...).

Je laisse le mot de la fin à Leland Hartwell – il ne faut jamais rater une occasion de citer Leland Hartwell : « One of the most powerful aspect of carrying out a genetic screen is that we approach biology with humility – we allow the organism to tell us which are the important functions ».

1.2 *RAD53-DL*, un allèle dominant létal conditionnel

L'approche génétique développée au laboratoire utilise un allèle dominant létal conditionnel de *RAD53*, l'allèle *RAD53-DL* (Marsolier et al, 2000). *RAD53-DL* est constitué de la fusion de la séquence codante de *RAD53* avec celle codant la GFP (Green Fluorescent Protein) clonée dans le plasmide pCM183 qui place ce gène chimère sous le contrôle de l'opérateur tétracycline TetO, répressible par la doxycycline (Gari et al, 1997) (**figure RI 1**).

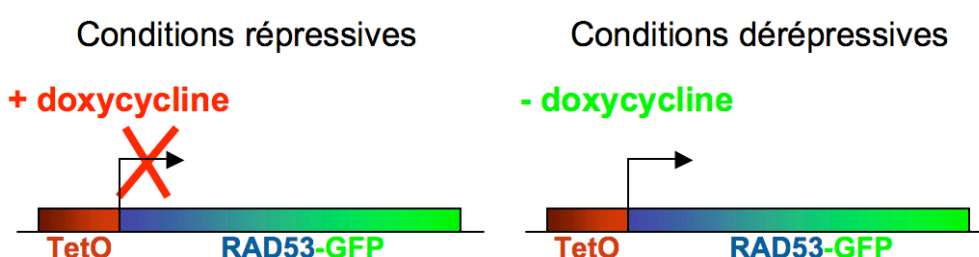


Figure RI 1. L'allèle dominant létal conditionnel *RAD53-DL*

RAD53-DL est constitué de la fusion des séquences codantes de *RAD53* et de la GFP placée sous le contrôle de l'opérateur tétracycline TetO répressible par la doxycycline.

RAD53-DL complémente un mutant *rad53Δ*, ce qui démontre la fonctionnalité de cette construction. En conditions dérépressives, *ie* sans doxycycline, la surexpression de Rad53-DL entraîne une très forte perturbation de la croissance. Elle est même létale en présence de certains stress génotoxiques¹⁵. De plus, l'utilisation d'un gène rapporteur *RNR3-LacZ* a montré que *RAD53-DL* est capable de suractiver la transcription de gènes cibles de Rad53 (Marsolier et al, 2000). Rad53-DL se comporte donc comme une forme hyperactive de Rad53 et déclenche, en absence de stress exogène, des réponses cellulaires normalement induites par des dommages de l'ADN ou un blocage de la réplication.

Un premier crible génétique utilisant *RAD53-DL* visait à identifier des gènes dont la surexpression supprime sa toxicité. Il a permis de découvrir les deux premiers régulateurs négatifs connus de Rad53. Il s'agit des phosphatases de type PP2C Ptc2 et Ptc3, qui participent à l'inactivation des checkpoints après une cassure double-brin de l'ADN (Leroy et al, 2003). Notre laboratoire a établi que cette voie de régulation est conservée dans les cellules humaines : un des homologues humains de Ptc2 et Ptc3, la phosphatase 2C Wip1 codée par l'oncogène PPM1D se lie à Chk2 et la déphosphoryle en réponse à un stress génotoxique (Oliva-Trastoy et al, 2007).

D'autres protéines qui avaient déjà été caractérisées pour leurs interactions fonctionnelles ou physiques avec Rad53, telles que Crt1 et Asf1 (voir introduction) ou encore Top3 (Chakraverty et al, 2001) (A. Peyroche, données non publiées) ont été retrouvées dans un

¹⁵ Il avait déjà été rapporté que la surexpression de *RAD53* perturbe le cycle cellulaire (Zheng et al, 1993; Allen et al, 1994).

crible similaire utilisant *RAD53-DL* intégré au locus *TRP1*, confirmant tout l'intérêt de cet allèle.

1.3 Un crible à l'échelle du génome pour identifier de nouveaux régulateurs positifs et des substrats de Rad53

Un deuxième crible génétique utilisant *RAD53-DL* a été développé au cours de ma thèse pour identifier de nouveaux régulateurs positifs et des cibles de Rad53. Notre hypothèse est que la toxicité de Rad53-DL pourrait être réduite en absence (i) des protéines requises pour son activation et (ii) des cibles physiologiques de Rad53 dans la voie des checkpoints, substrats directs ou non, et dont la suractivation par Rad53-DL conditionne sa toxicité (**figure RI 2**).

Nous avons donc décidé de rechercher, à l'échelle du génome, des mutants capables de tolérer l'expression de *RAD53-DL*. Plus précisément, nous avons testé l'impact de la délétion (un anglicisme désignant l'inactivation totale d'un gène) de chacun des 4600 gènes non-essentiels chez *S. cerevisiae* sur la toxicité de *RAD53-DL*.

Le Dr Marsolier-Kergoat avait déjà remarqué que l'inactivation de *DUN1*, cible de Rad53 impliquée dans l'activation transcriptionnelle des gènes *RNR* et dans l'arrêt en G2/M (voir introduction), pouvait partiellement supprimer les effets délétères de Rad53-DL (Marsolier et al, 2000). Un encouragement supplémentaire, s'il en était besoin.

Bien sûr, compte tenu de l'imbrication des différentes voies de la réponse aux dommages de l'ADN (DDR), il n'est pas exclu que notre crible identifie des gènes impliqués dans la DDR par d'autres mécanismes que les checkpoints, tels des composants des systèmes de réparation, de la réponse transcriptionnelle, etc.

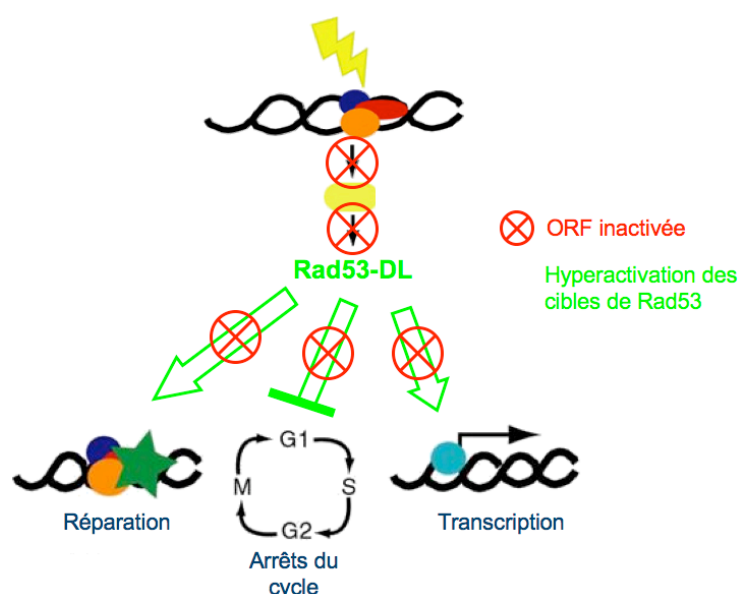


Figure RI 2. Principe du crible suppresseur de la toxicité de *RAD53-DL*

La toxicité de Rad53-DL due à son hyperactivité devrait être réduite en absence (i) des protéines requises pour son activation et (ii) des cibles physiologiques de Rad53.

2. De la théorie à la pratique

Evaluer l'effet de l'inactivation de chaque gène non-essentiel de *S. cerevisiae* sur la survie en présence de *RAD53-DL* nécessite donc d'introduire cet allèle dans plus de 4600

mutants, puis de tester systématiquement la croissance des 4600 souches obtenues. Ce qui demande quelques réglages.

2.1 La collection de mutants EUROSCARF

Issue du projet d'inactivation systématique de toutes les ORF identifiées lors du séquençage du génome de la levure de boulangerie (Saccharomyces Genome Deletion Project), la collection EUROSCARF regroupe plus de 4600 souches haploïdes mutantes, couvrant l'ensemble des gènes non-essentiels chez *S. cerevisiae* (<http://web.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/index.html>). Chaque souche porte la mutation nulle (ou délétion) d'une ORF particulière réalisée par intégration d'une cassette KANMX4 de résistance à la généticine (ou G418), un inhibiteur de la traduction (Sambrook & Russell, 2001). Cette cassette est flanquée d'étiquettes de 20pb spécifiques de chaque gène inactivé permettant son identification par séquençage. Néanmoins, d'après notre propre expérience et celle d'autres laboratoires, cette collection contient au moins 10% d'erreurs (un gène supposément inactivé mais en fait toujours présent étant le cas le plus fréquent).

2.2 Conception du crible

Nous disposons au laboratoire de la collection EUROSCARF dans les souches haploïdes BY4741 et BY4742 (dérivées du fond génétique S288C), de type sexuel opposé. La banque se présente sous la forme d'une quarantaine de plaques 96 puits contenant chacun le délétant d'un gène. D'un maniement aisé pour tester chaque mutant isolément au sein de cribles fonctionnels – particulièrement si l'on dispose d'un robot, ce qui n'est pas notre cas – ce format est moins propice au but que nous nous sommes fixés, à savoir (i) l'introduction de *RAD53-DL* dans chacune de ces souches puis (ii) le test systématique de leur croissance. Quelle que soit la méthodologie choisie, aussi efficace et simple soit-elle, la répéter 4600 fois serait en effet particulièrement long et fastidieux. Le premier point a été résolu grâce au don précieux du Dr Jacquier (Institut Pasteur, Paris) d'une version reformatée de la banque de délétants sous la forme de 43 groupes d'environ 110 souches. Ce regroupement s'est fait sur la base de la nomenclature des gènes chez la levure, qui est le reflet de leur localisation physique. Ainsi, 3 groupes couvrent en moyenne l'ensemble des gènes inactivés d'un chromosome. En conséquence, chaque groupe comprend indistinctement des mutants ayant une croissance proche de la souche sauvage et des mutants dont la croissance est perturbée (un groupe rassemblant des souches dont la croissance est particulièrement ralentie a néanmoins été conçu pour limiter cet écueil). Le deuxième point exige de définir une stratégie permettant de sélectionner directement les mutants capables de tolérer l'expression de *RAD53-DL*, en lieu et place d'une analyse individuelle difficilement envisageable. Les paragraphes suivants décrivent pas à pas la stratégie employée, dont le schéma global est donné dans la **figure RI 6**.

2.2.1 Souche appât

2.2.1.1 Analyses préliminaires

La manipulation des 43 groupes de mutants est aisée, et permet d'envisager l'introduction de *RAD53-DL* dans l'ensemble des souches soit par un protocole de transformation chimique, soit par conjugaison d'une souche appât exprimant *RAD53-DL* avec les mutants de type sexuel opposé.

Mais avant cela, il est indispensable de vérifier que l'allèle *RAD53-DL*, lorsqu'il est exprimé dans le fond génétique de la collection de mutants, affecte effectivement la croissance des cellules, et ce dans des proportions compatibles avec un crible visuel basé sur le rétablissement de cette croissance. Nous avons donc transformé la souche BY4742 avec le plasmide pCM183-*RAD53-DL* et procédé à un test de croissance en gouttes (plus communément appelé « spotting ») pour mesurer son impact sur la viabilité et la croissance cellulaires. Nous avons constaté que l'expression de *RAD53-DL* n'était que faiblement toxique dans notre fond génétique, même en présence du stress génotoxique camptothécine (CPT, un inhibiteur de la topoisomérase I qui provoque des cassures double-brin de l'ADN lors du passage de la fourche de réplication (Friedberg et al, 2005)) (données non présentées). Les effets sur la croissance étaient en tout cas beaucoup trop limités pour le crible que nous nous proposons de réaliser. Nous avons donc testé la toxicité de *RAD53-DL* une fois cet allèle intégré au génome.

2.2.1.2 Construction de la souche appât

Notre but était d'intégrer *RAD53-DL* à un locus précis, le locus *TRP1*. Pour ce faire, le plasmide pCM183-*RAD53-DL-TRP1* a tout d'abord été rendu intégratif par une digestion enzymatique permettant l'excision des séquences ARS/CEN. Il a ensuite été linéarisé grâce à une coupure au niveau du locus *TRP1* pour favoriser son intégration au locus *TRP1* endogène. Pour détecter cette intégration, une cassette KANMX4 avait au préalable été insérée dans le gène *TRP1* d'une souche BY4742, afin de le « couper en 2 ». Après transformation, l'insertion de pCM183-*RAD53-DL-TRP1*_{intégratif} permettra de reconstituer un gène *TRP1* fonctionnel ; les clones ayant intégré pCM183-*RAD53-DL-TRP1*_{intégratif} au locus *TRP1* seront donc sélectionnés pour leur capacité à pousser en absence de tryptophane. Cette stratégie est résumée dans la **figure RI 3A**. Tous les clones que nous avons isolés étaient également résistants au G418.

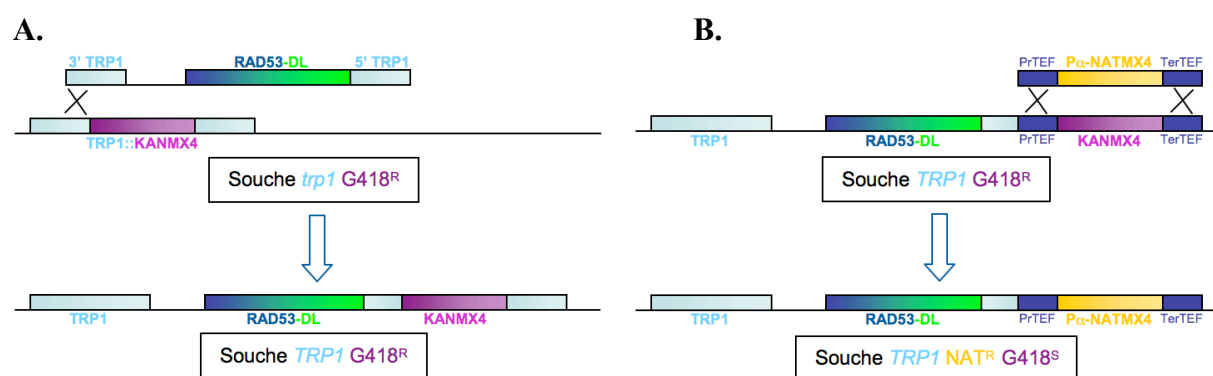


Figure RI 3. Construction de la souche appât

A. Introduction de pCM183-*RAD53-DL-TRP1*_{intégratif} au locus *TRP1* par recombinaison homologue.

B. Remplacement par recombinaison homologue de la cassette de résistance KANMX4 par la cassette Pα-NATMX4. La recombinaison a lieu au niveau du promoteur PrTEF et du terminateur TerTEF communs aux 2 cassettes.

2.2.1.3 Caractérisation de la souche appât

Différents clones ont été testés en spotting pour mesurer la toxicité de *RAD53-DL* intégré au locus *TRP1*. Cette toxicité, fort heureusement, est apparue beaucoup plus forte que lorsque *RAD53-DL* est porté sur un plasmide. Mais de façon surprenante, deux types de phénotypes

ont été retrouvés (**figure RI 4A**). Le premier phénotype correspond à une perturbation modérée de la croissance des cellules en absence de doxycycline (souche BLT15). Au contraire, le deuxième phénotype correspond lui à un arrêt total de la croissance en conditions répressives (souche BLT18). Cette gradation de la toxicité est retrouvée en présence de stress génotoxiques : alors que la souche BLT15 n'est hyper-sensible à la CPT et au 4-Nitroquinoline 1-Oxide (4NQO) qu'en absence de doxycycline, la souche BLT18 est incapable de pousser, pour des doses identiques d'agents génotoxiques, même en conditions permissives. La moitié des clones obtenus après transformation de pCM183-*RAD53-DL*_{intégratif} présente le phénotype de BLT15, et l'autre moitié celui de BLT18. Il est ainsi possible que le sens d'insertion de *RAD53-DL* au niveau du locus *TRP1* – rendant le promoteur plus ou moins accessible, le mettant sous l'influence d'une séquence enhancer, etc – ou un nombre différent de plasmides insérés (sous forme de concatémère) soit à l'origine de ces différences. Une analyse par digestion enzymatique et Southern blot répondrait très probablement à cette question.

Alors que l'on retrouve l'effet létal de *RAD53-DL* en présence des stress génotoxiques CPT et 4NQO, l'expression de *RAD53-DL*, que ce soit pour BLT15 ou BLT18, ne confère pas d'hyper-sensibilité aux ultra-violets ni à l'hydroxyurée (données non présentées), contrairement à ce qui a été décrit par le Dr Marsolier-Kergoat dans la souche YPH499 (Marsolier et al, 2000). De l'importance du fond génétique... Les souches BLT15 et BLT18 sont légèrement sensibles à la température, mais ne sont affectées ni par le benomyl (une drogue entraînant la dépolymerisation des microtubules), ni par une croissance en milieu galactose (données non présentées).

Nous avons ensuite contrôlé par Western blot l'expression de la protéine Rad53-DL en absence et en présence de doxycycline dans les souches BLT15 et BLT18 (**figure RI 4C**). Pour les deux souches, dans les conditions répressives, Rad53-DL est faiblement détectée, reflet du niveau de fuite de l'opérateur TetO. Cette faible expression de Rad53-DL ne semble pas suffisante pour affecter la croissance des cellules.

Sans doxycycline, l'expression de Rad53-DL est fortement augmentée, et l'on détecte également des formes phosphorylées de Rad53-DL et de la protéine Rad53 endogène, particulièrement dans BLT18, ce qui reflète probablement l'autophosphorylation en *trans* de Rad53/Rad53-DL induite par une augmentation de la concentration locale de Rad53-DL (voir introduction). Conformément aux résultats du spotting, c'est en présence de stress génotoxique, ici la camptothécine, que la quantité de Rad53-DL, et donc sa toxicité, sont maximales (Rad53/Rad53-DL étant probablement stabilisées après un stress génotoxique). Les formes phosphorylées de Rad53-DL sont particulièrement visibles. Ces résultats confirment de plus que Rad53-DL est une forme fonctionnelle de Rad53, sensible aux mêmes mécanismes de régulation suite à un stress génotoxique que la protéine sauvage. Enfin, et comme attendu, les différences de phénotype observées entre BLT15 et BLT18 sont corrélées au niveau d'expression de Rad53-DL dans ces souches, quelles que soient les conditions testées.

Par ailleurs, nous avons vérifié par microscopie à fluorescence que la protéine Rad53-DL, comme Rad53, présente une localisation nucléaire (Zheng et al, 1993) (**figure RI 4D**). Nous avons également confirmé par croisement de BLT15 et BLT18 avec la souche sauvage BY4741 et en suivant le phénotype des spores obtenues que l'allèle *RAD53-DL* est bien intégré à un seul locus.

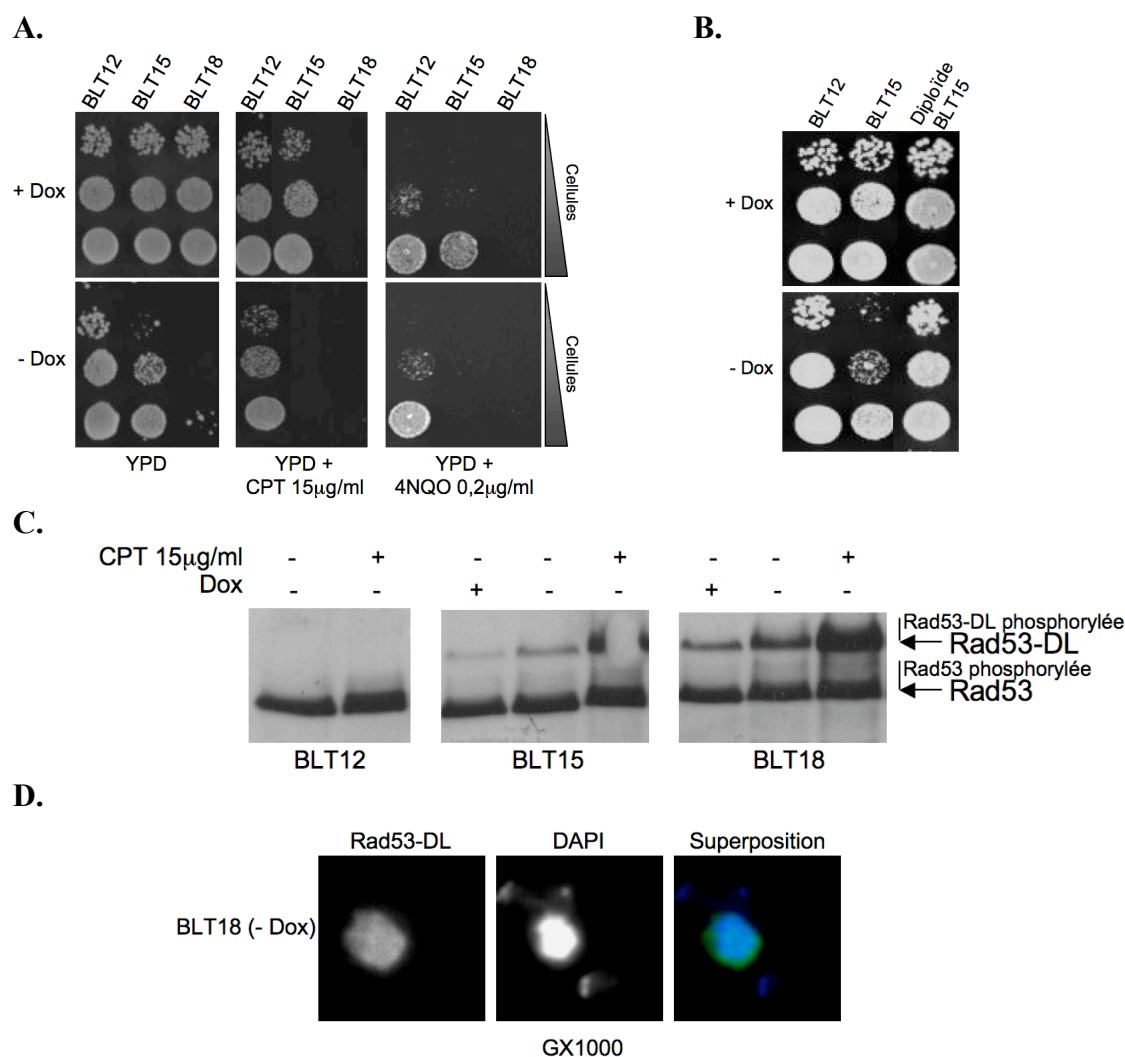


Figure RI 4. Caractérisation de la souche appât

A. Test de croissance en gouttes des souches BLT12 (souche contrôle dans laquelle a été intégré au locus *TRP1* un plasmide pCM183^{intégratif} vide), BLT15 et BLT18. Des dilutions sériees des souches BLT12, BLT15 et BLT18 ont été étalées sous forme de gouttes (« spottées ») sur des boîtes contenant le milieu de culture YPD seul ou additionné de CPT (15µg/mL) ou de 4NQO (0,2µg/mL), en conditions permissives (avec doxycycline (+Dox)) ou en conditions restrictives (sans doxycycline (-Dox)). Les cellules ont été incubées 2 jours à 30°C.

B. Des dilutions sériees des souches BLT12, BLT15 et d'un diploïde issu du croisement BY4741xBLT15 ont été spottées sur milieu YPD en conditions permissives (+Dox) ou restrictives (-Dox). Les cellules ont été incubées 2 jours à 30°C.

C. Visualisation de l'expression de Rad53-DL en Western blot. Des extraits protéiques totaux réalisés à partir de souches BLT12, BLT15 et BLT18 cultivées en conditions permissives (+Dox) ou restrictives (-Dox), en absence ou en présence de CPT (15µg/mL) ont été analysés par Western blot avec des anticorps anti-Rad53. Les formes phosphorylées de Rad53 et Rad53-DL entraînent un retard de migration visualisé sous forme de smire.

D. Visualisation de Rad53-DL par microscopie à fluorescence. La fluorescence de l'étiquette GFP de Rad53-DL a été observée directement par microscopie dans des cellules BLT18 cultivées en absence de doxycycline (-Dox). Les noyaux ont été marqués au DAPI (grossissement X1000).

2.2.2 Intégration de *RAD53-DL* dans la collection EUROSCARF

L'utilisation de *RAD53-DL* cloné dans un plasmide eût rendu assez simple le criblage de la collection de mutants EUROSCARF : transformation de pCM183-*RAD53-DL* dans les 43 groupes de délétants puis étalement des cellules sur un milieu permettant de sélectionner à la fois le plasmide et la cassette de résistance à la généticine marquant le délétion, et ce en absence de doxycycline, afin que seuls les mutants capables de tolérer *RAD53-DL* puissent

pousser. Or, comme nous l'avons vu plus haut, la toxicité du plasmide pCM183-*RAD53-DL* est insuffisante pour un tel crible. Il est donc indispensable d'intégrer *RAD53-DL* dans le génome des 4600 mutants de la collection EUROSCARF. L'obtention systématique de deux types de phénotypes par transformation de la forme intégrative de pCM183-*RAD53-DL* empêche quant à elle d'appliquer cette approche à l'échelle de la banque de délétants – les résultats seraient ininterprétables. La seule alternative consiste donc à croiser la souche appât exprimant *RAD53-DL*, soit BLT15, soit BLT18, avec les 43 groupes de délétants du type sexuel opposé.

2.2.2.1 Toxicité de *RAD53-DL* dans une souche diploïde

Le croisement de la souche appât avec les mutants de la banque aboutit à la formation de diploïdes arborant l'allèle *RAD53-DL* et hétérozygotes pour une mutation donnée. On pourrait alors imaginer réaliser le crible à ce stade. Cependant, d'une part la grande majorité des mutations perte de fonction chez la levure sont récessives, c'est à dire que les diploïdes hétérozygotes n'ont pas de phénotype ; il est difficile d'envisager dans ce cas qu'elles puissent avoir un quelconque effet sur la toxicité de *RAD53-DL*. D'autre part, nous avons observé que l'expression de *RAD53-DL* dans un diploïde n'est pas ou très peu toxique (sauf en présence de stress génotoxique), probablement à cause d'une certaine « dilution » de Rad53-DL par la protéine Rad53 endogène (**figure RI 4B**).

Ainsi, l'état diploïde n'est qu'un passage obligé afin d'obtenir *in fine* des cellules haploïdes associant dans leur génome la délétion d'un gène et l'allèle *RAD53-DL*, cibles de notre crible. Ces souches seront obtenues par la mise en sporulation des diploïdes suivie d'une sélection des spores issues de la méiose.

2.2.2.2 Cassette de sélection *PαNAT*

Les délétions de la banque EUROSCARF ont été réalisées par insertion d'une cassette KANMX4 de résistance à la généticine. Ce marqueur permet donc de suivre et sélectionner les cellules dont un gène a été invalidé. L'allèle *RAD53-DL* introduit dans les souches BLT15/BLT18 est associé à la même cassette de résistance (voir paragraphe 2.2.1.2). Dans ce contexte, il est impossible de sélectionner les cellules comportant à la fois *RAD53-DL* et une délétion. Ce problème peut néanmoins être très facilement résolu en changeant la cassette de sélection KANMX4 associée à *RAD53-DL* par la cassette NATMX4 conférant une résistance à la nourséothricine, un antibiotique inhibant la synthèse protéique (Goldstein & McCusker, 1999).

Le passage par l'état diploïde est lui plus problématique. En effet, le taux de sporulation des diploïdes, particulièrement dans le fond génétique utilisé, n'est jamais de 100%. Le site du Saccharomyces Genome Deletion Project annonce un taux de sporulation de 20%, surévalué d'après notre expérience. Or, les diploïdes issus du croisement de la souche appât avec les mutants de la banque posséderont nécessairement les marqueurs de sélection de l'allèle *RAD53-DL* et de la délétion d'un gène. N'étant pas affectés par l'expression de *RAD53-DL*, ils seront une source considérable de faux positifs lors de la sélection des mutants haploïdes capables de supprimer la toxicité de *RAD53-DL*. Il est donc indispensable de pouvoir éliminer les diploïdes n'ayant pas subi la méiose.

Des méthodes chimiques (traitement à l'éther diéthylique) existent pour éliminer spécifiquement les levures en croissance végétative sans affecter la survie des spores (Guthrie & Fink, 2004), mais leur efficacité est insuffisante. Heureusement, la solution existe ! Elle

consiste à mettre la cassette NATMX4 sous le contrôle du promoteur de *MF(α)2* (Mating Factor alpha 2) qui permet son expression spécifiquement dans les cellules haploïdes de type sexuel Mat α (Jarvis et al, 1988). Le Dr Alain Jacquier nous a fourni le plasmide pGID3 contenant une telle construction. La cassette PαNATMX4 a alors été excisée par digestion enzymatique, puis utilisée pour transformer les souches BLT15 et BLT18 où elle a été insérée par recombinaison homologue en lieu et place de la cassette KANMX4 (**figure RI 3B**).

Ainsi, après la sporulation, les cellules seront étalées sur un milieu contenant à la fois de la généticine et de la nouséothricine afin de ne sélectionner que les haploïdes associant dans leur génome *RAD53-DL* et la délétion d'un gène. De plus, en se plaçant dans les conditions où *RAD53-DL* est exprimé, seuls les mutants supprimant sa toxicité pourront pousser. Il ne restera plus alors qu'à identifier les gènes inactivés dans les clones obtenus. Seulement... Seulement, pour des raisons mal définies, le promoteur de *MF(α)2* continue à être actif dans une fraction non-négligeable de diploïdes, créant autant de faux-positifs pour ce qui nous concerne. Leur croissance étant plus rapide que celle des cellules haploïdes, et n'étant pratiquement pas affectés par l'expression de *RAD53-DL*, ce seront d'ailleurs probablement les premiers à apparaître. Les souches BY4741 et BY4742 diffèrent sur deux points : leur type sexuel, Mata pour BY4741, Matα pour BY4742, et leurs auxotrophies. BY4741 est auxotrophe pour la lysine, c'est à dire qu'elle est incapable de synthétiser cet acide aminé et donc de pousser en son absence, alors que BY4742 est auxotrophe pour la méthionine. Les diploïdes issus d'un croisement entre BY4741 (*met15 LYS2*) et BY4742 (*MET15 lys2*) sont prototrophes à la fois pour la lysine et la méthionine (*MET15 LEU2*). La solution adoptée est drastique : une fois isolés, les supprimeurs seront testés pour leur capacité à pousser en absence de méthionine ou de lysine. Seuls seront pris en compte ceux qui sont auxotrophes pour l'un au moins de ces acides aminés. Les diploïdes seront ainsi totalement éliminés des analyses suivantes, de même, malheureusement, qu'environ 25% des supprimeurs haploïdes (dont le génotype sera soit *met15 LYS2*, *met15 lys2*, *MET15 lys2*, *MET15 LYS2*). Aux grands maux les grands remèdes.

2.2.2.3 Choix de la souche appât

Deux souches appâts, BLT15 et BLT18, exprimant *RAD53-DL* associée à la cassette de sélection PαNATMX4 ont été construites, caractérisées et vérifiées. Elles diffèrent par le niveau d'expression, et donc de toxicité, de *RAD53-DL* : BLT18 n'est pas viable en absence de doxycycline alors qu'une croissance résiduelle est observée dans ces conditions pour BLT15. Le choix de la souche appât dépend donc de la stringence souhaitée pour le crible. La souche BLT15 a été choisie afin d'isoler un plus grand nombre de supprimeurs de la toxicité de *RAD53-DL*, soit autant de partenaires potentiels de Rad53.

2.2.2.4 Contrôle de suppression de la toxicité de *RAD53-DL*

Avant de se lancer dans le crible, il faut auparavant vérifier que la souche BLT15 est réellement apte à identifier de nouveaux partenaires de Rad53, régulateurs positifs ou substrats. BLT15 a donc été croisée avec deux délétants de la collection EUROSCARF, BY4741 *rad9Δ* et BY4741 *ura2Δ*, et la croissance des souches *RAD53-DL rad9Δ* et *RAD53-DL ura2Δ* obtenues après sporulation a été testée en absence de doxycycline. Le gène *RAD9* codant un activateur de Rad53 (voir introduction), son absence devrait *a priori* supprimer, au moins partiellement, la toxicité de *RAD53-DL*. L'absence du gène *URA2* de la voie de synthèse de l'uracile devrait quant à elle être parfaitement neutre vis à vis de *RAD53-DL*. Les

résultats du spotting sont conformes à nos hypothèses : en absence de doxycycline, la souche *RAD53-DL rad9Δ* a une croissance nettement améliorée par rapport à BLT15, alors que la souche *RAD53-DL ura2Δ* pousse rigoureusement comme cette dernière (**figure RI 5**). On conclue donc que *RAD9* est bien un gène suppresseur : son inactivation supprime la toxicité de *RAD53-DL*. Ceci valide notre approche génétique, et nous presse de la mettre en pratique ! On peut enfin remarquer que la suppression de toxicité de *RAD53-DL* dans la souche *rad9Δ* ne permet pas de retrouver une croissance comparable à la souche contrôle BLT12, l'absence de Rad9 ne limitant très probablement qu'en partie l'activation de Rad53-DL. Surtout, ce résultat nous conforte dans l'utilisation de la souche BLT15 plutôt que BLT18 en tant qu'appât pour le crible : si même l'absence de *RAD9* ne peut restaurer que partiellement la croissance de BLT15, on peut supposer que seule une poignée de mutants seraient susceptibles de sauver BLT18. Les dés sont jetés...

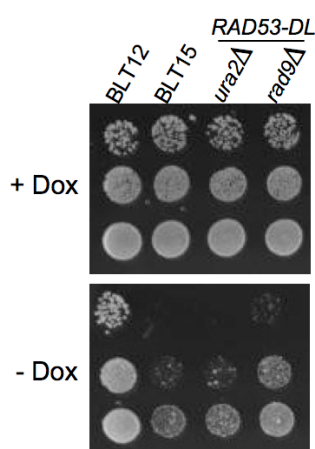


Figure RI 5. Contrôles de suppression de la toxicité de *RAD53-DL*

Des dilutions sériées des souches BLT12, BLT15 et *RAD53-DL ura2Δ* et *RAD53-DL rad9Δ* ont été spottées sur milieu YPD en conditions permissives (+Dox) ou restrictives (-Dox). Les cellules ont été incubées 2 jours à 30°C.

2.2.3 Conclusion

Les contraintes évoquées pour la réalisation du crible ont ainsi imposé les conditions de sa réalisation. Tout d'abord, croiser la souche appât BLT15 exprimant *RAD53-DL* avec les 43 groupes de délétants et sélectionner les diploïdes – étape de conjugaison. Ensuite, induire la méiose des diploïdes pour récupérer des cellules haploïdes associant la délétion d'un gène avec *RAD53-DL* – étape de sporulation. Enfin, sélectionner les mutants haploïdes capables de tolérer l'expression de *RAD53-DL*, c'est à dire de pousser en absence de doxycycline – étape finale de sélection des suppresseurs. Ces étapes sont résumées dans la **figure RI 6**.

3. Le crible en pratique

Une fois définie, chaque étape a fait l'objet d'une rigoureuse mise au point avant passer à sa réalisation. La composition des milieux, la concentration des antibiotiques et les protocoles utilisés sont précisés dans les *Supplemental data* de (Le Tallec et al, 2007).

3.1 Conjugaison

Afin de maximiser l'efficacité de conjugaison, des cultures en phase exponentielle de la souche appât et des groupes de délétants seront croisées pendant 5 heures sur un milieu riche en présence de doxycycline.

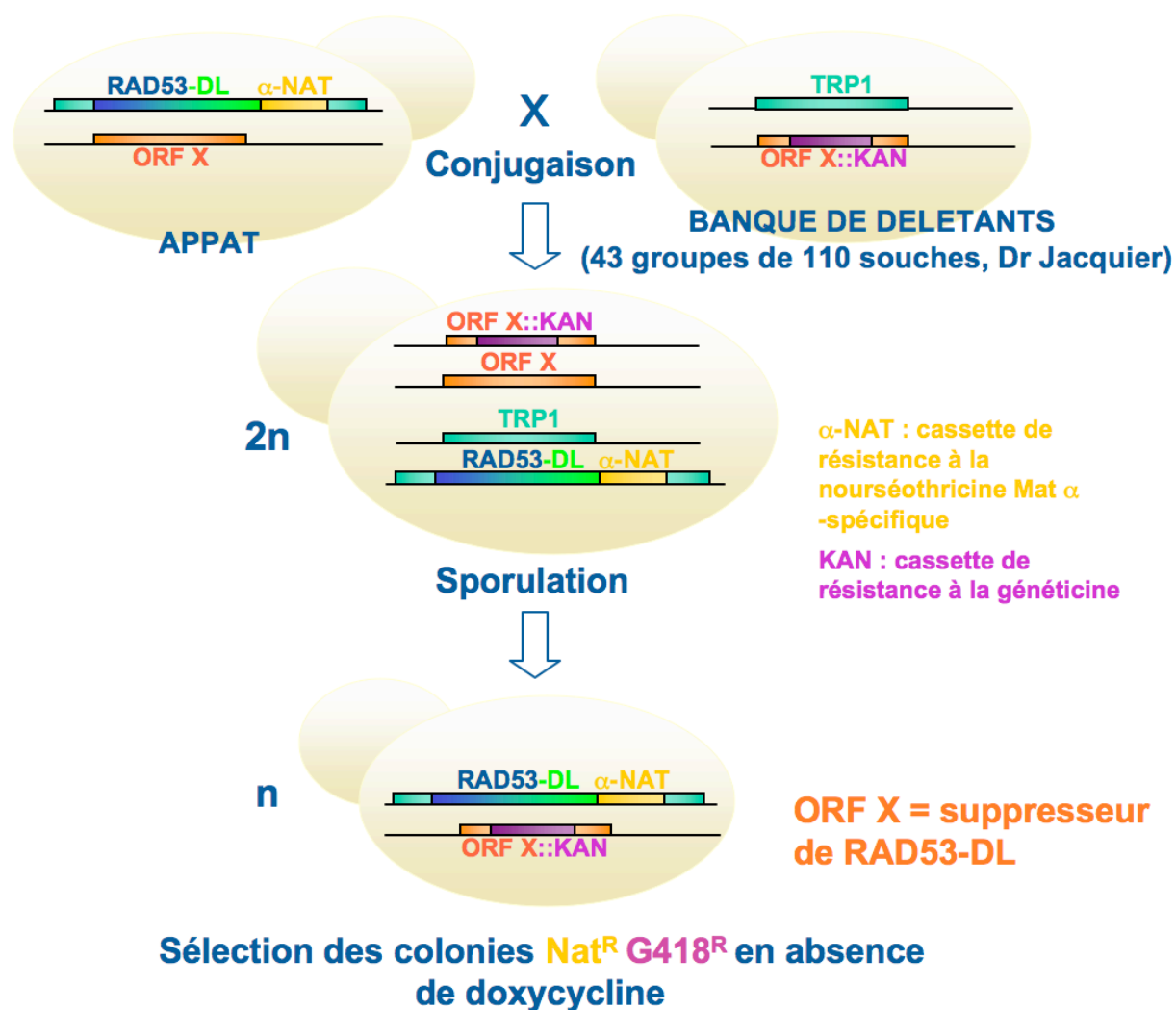


Figure RI 6. Schéma général du crible suppresseur de la toxicité de *RAD53-DL*

RAD53-DL a été introduit dans les 4627 délétants de la collection EUROSCARF en utilisant une version reformatée de la banque composée de 43 groupes de 110 souches. Les cellules haploïdes associant dans leur génome l'allèle *RAD53-DL* et une délétion et capables de pousser en absence de doxycycline ont été sélectionnées.

3.2 Sélection des diploïdes

Comme nous l'avons vu, les diploïdes issus d'un croisement entre BY4741 (fond génétique de la collection de mutants) et BY4742 (fond génétique de BLT15) peuvent être facilement sélectionnés sur un milieu dépourvu à la fois de lysine et de méthionine. Une contrainte intrinsèque au fond génétique BY47XX nous a fait adopter un autre protocole. Comme il a été précisé plus haut, le taux de sporulation est faible, et exige des conditions de présporulation particulières, en l'occurrence la culture des diploïdes en milieu enrichi en glucose, le milieu GNA, ce qui proscrit l'utilisation des marqueurs d'auxotrophie. Restent alors les cassettes de résistance aux antibiotiques. Le génome issu des délétants permettra de pousser en présence de généticine, mais la cassette PαNATMX4 apportée par BLT15 ne sera quant à elle pas exprimée dans les diploïdes. La souche appât a donc été au préalable transformée avec le plasmide pGID1 (un nouveau don du Dr Alain Jacquier – mais qui d'autre ?) portant une cassette de résistance à l'antibiotique hygromycine B (Sambrook & Russell, 2001). Après croisement de BLT15+pGID1 avec les 43 groupes de délétants sur GNA+doxycycline, les

diploïdes seront ensuite sélectionnés sur GNA+doxycycline+hygromycine+généticine sur la nuit (**figure RI 7**).

Après la sélection des diploïdes, le plasmide pGID1 pourrait se maintenir dans les cellules jusqu'au stade de sélection des suppresseurs. C'est pourquoi nous avons vérifié que pGID1 n'a aucune influence sur la toxicité de *RAD53-DL* (données non présentées).

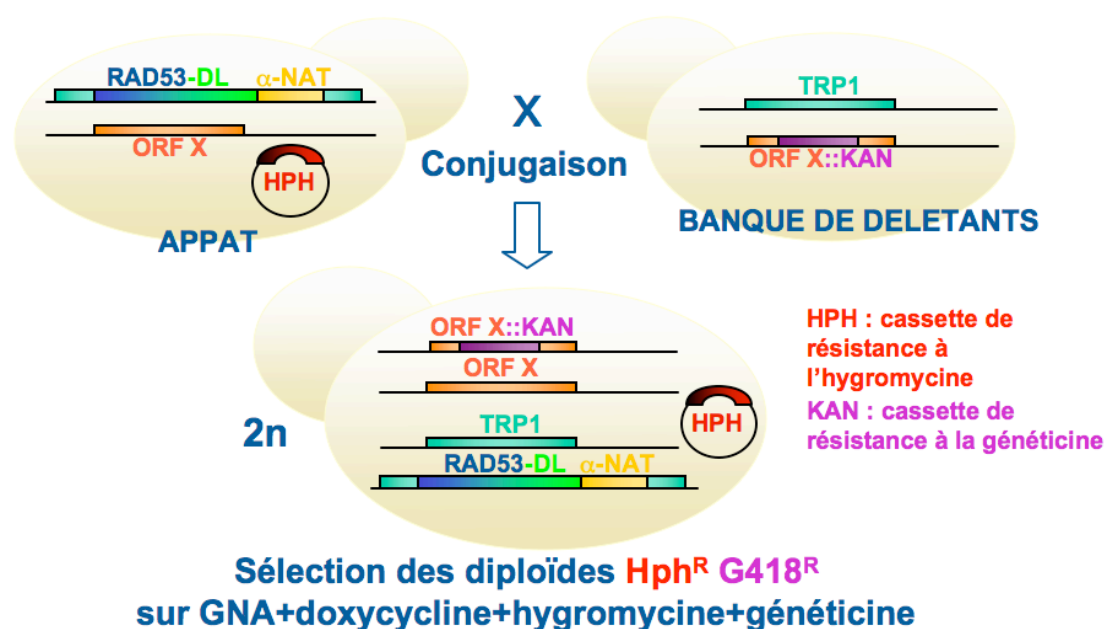


Figure RI 7. Sélection des diploïdes

La souche appât a été transformée avec le plasmide pGID1 conférant la résistance à l'hygromycine. Après croisement avec la banque de délétants (qui sont résistants à la généticine), les diploïdes sont sélectionnés sur GNA+hygromycine+généticine en conditions permissives.

3.3 Sporulation

C'est l'étape critique du crible : obtenir un nombre suffisant de cellules haploïdes associant *RAD53-DL* à une délétion donnée malgré un taux de sporulation très faible. En effet, la mise au point de cette étape a révélé que la doxycycline, indispensable pour empêcher l'expression de *RAD53-DL*, inhibe fortement la sporulation.

Ainsi, en utilisant les conditions de présporulation en GNA et de sporulation en milieu liquide (5 jours à 25°C puis 3 jours à 30°C) conseillés pour les diploïdes BY47XX, on retrouve un taux de sporulation proche des 20% annoncés sur le site du Saccharomyces Genome Deletion Project. Or ce taux chute en dessous de 1% en présence de doxycycline à la concentration de 5mg/mL nécessaire à une répression optimale de *RAD53-DL*. D'autres laboratoires utilisant cet antibiotique ont constaté le même effet (communications personnelles). Celui-ci semblerait lié à une perte des mitochondries induite par la doxycycline, ce qui perturberait *in fine* la sporulation (pour l'influence de la respiration et du génome mitochondrial sur la sporulation, (Codon et al, 1995).

Après sporulation, notre objectif est d'obtenir, pour chaque gène inactivé, au moins 100 clones associant *RAD53-DL* et la délétion. Le nombre X de diploïdes à mettre à sporuler pour chaque groupe de délétants va donc dépendre de :

- a, le nombre de délétants par groupe, soit 110 en moyenne
- b, le nombre souhaité de clones haploïdes associant *RAD53-DL* et une délétion particulière, ici 100
- c, le taux de sporulation des diploïdes. Nous espérons au minimum 0,5% de sporulation
- d, la probabilité d'obtenir un haploïde associant *RAD53-DL* et une délétion particulière, soit 0,25 (25% des spores en moyenne, moins pour les délétions proches du locus *TRP1* où a été intégré *RAD53-DL*)
- e, la probabilité que la souche haploïde associant *RAD53-DL* et une délétion particulière soit de type sexuel $\text{Mat}\alpha$ permettant l'expression de la cassette de résistance $\text{P}\alpha\text{NATMX4}$, soit en moyenne 0,5 (mais évidemment moins pour les délétions proches du locus *MAT*)

Soit $X = (a \cdot b) / (c \cdot d \cdot e) = (110 \cdot 100) / (0,005 \cdot 0,25 \cdot 0,5) = 17,6 \cdot 10^6$ diploïdes

Il faut aussi prendre en compte la sous-représentation des diploïdes issus du croisement de BLT15 avec des mutants à croissance ralentie (à effet dominant) ou des mutants de conjugaison, la non-prise en compte des haploïdes prototrophes pour la lysine et la méthionine (un quart des haploïdes), ainsi que la viabilité des spores, qui est bien sûre très hétérogène selon les mutants. Au final, 30 millions de diploïdes par groupe seront mis à sporuler.

3.4 Sélection des supresseurs de la toxicité de *RAD53-DL*

Chez la levure *S. cerevisiae*, les 4 spores haploïdes issues de la méiose sont emprisonnées au sein d'un asque, structure rigide dont l'éclatement entraîne la libération des spores qui pourront alors germer et reprendre leur cycle de croissance végétative. Un traitement post-sporulation des cellules avec de la zymolyase, un enzyme permettant la lyse des parois cellulaires des levures, a été envisagé afin de fragiliser les asques et libérer davantage de spores. Nous avons en fait constaté une baisse de la viabilité des spores, la zymolyase s'attaquant outrageusement à leur paroi dans les conditions testées ! Après 8 jours de sporulation, les cellules seront donc directement étalées sur un milieu riche YPD contenant de la généticine (sélection de la délétion) et de la nourséothricine (sélection de *RAD53-DL*), en absence de doxycycline. Ainsi, seuls seront sélectionnés les mutants haploïdes ($\text{Mat}\alpha$) pouvant tolérer l'expression de *RAD53-DL* – en tout cas seront-ils les premiers à pousser. En effet, la souche BLT15 présentant une certaine croissance résiduelle en absence de doxycycline, même les souches incapables de supprimer la toxicité de *RAD53-DL* finiront par apparaître. Il faut donc définir une « fenêtre temporelle » d'isolement des supresseurs. Pour ce faire, la souche appât BLT15 sera croisée avec les souches BY4741 *rad9* Δ et BY4741 *ura2* Δ , en lieu et place d'un groupe de mutants. L'apparition des clones *RAD53-DL rad9* Δ marquera ainsi approximativement le début de la « récolte » des supresseurs, celle des colonies *RAD53-DL ura2* Δ sonnant la fin de notre espérée moisson.

Un deuxième milieu de sélection a également été utilisé. Il diffère du premier par l'ajout de camptothécine à la concentration de 1µg/mL. Ce milieu plus stringent devrait permettre à la fois de supprimer presque totalement la croissance résiduelle de la souche BLT15, mais aussi de révéler des interactions induites par un stress génotoxique. 50% des cellules seront étalées après sporulation sur chacun de ces milieux.

3.5 Contrôles du crible

Plusieurs contrôles sont nécessaires pour s'assurer du bon déroulement du crible en conditions réelles. En plus de définir la « fenêtre temporelle » d'isolement des supresseurs, les croisements de la souche appât BLT15 avec les souches BY4741 *rad9Δ* et BY4741 *ura2Δ* serviront respectivement de contrôles positif et négatif du crible. Toujours dans les conditions du crible, 30 millions de diploïdes BLT15xBY4741 *ura2Δ* seront mis à sporuler et étalés sur le milieu de sélection YPD+généticine+nourséothricine, mais cette fois en présence de doxycycline. Ce contrôle permettra d'estimer le nombre maximal de clones détectables dans les conditions du crible (en plus de l'absence de toxicité de *RAD53-DL*, le mutant *ura2Δ* ne présente pas de défauts notables de croissance, viabilité, conjugaison, sporulation ou germination), et de vérifier qu'il est compatible avec nos estimations.

3.6 Biais du crible

L'utilisation de la banque de délétants EUROSCARF pour notre crible implique par définition que les gènes essentiels chez *S. cerevisiae* ne seront pas représentés. Les mutants de conjugaison ou de germination seront eux pratiquement exclus – de même que les mutants dominants de méiose/sporulation. L'hétérogénéité des mutants rassemblés au sein d'un des 43 groupes sera, malgré toutes les précautions prises, à l'origine d'une sous-représentation des souches dont la croissance est ralentie. Les délétions liées génétiquement à *TRP1* – c'est à dire situées à moins de 50cM du locus *TRP1* où est inséré *RAD53-DL-PαNATMX4* – ne pourront être associées à *RAD53-DL* qu'après crossing-over, soit avec une faible fréquence. Enfin, les hasards de la génétique seront source de quelques désagréments, particulièrement les mutations inactivant *RAD53-DL* qui donneront de faux positifs, et donc de faux espoirs. Surtout, le crible est basé sur l'apparition de clones dans une fenêtre temporelle donnée du fait de la croissance résiduelle de la souche BLT15 en absence de doxycycline. Des mutations supprimant potentiellement la toxicité de *RAD53-DL* mais affectant par trop la croissance de la souche seront donc irrémédiablement ignorées. Nobody's perfect !

4. Le crible comme si vous y étiez

Concrètement, après les étapes de conjugaison, de sélection des diploïdes et de sporulation décrites plus haut, une première moitié des cellules a été étalée sur des boîtes de Pétri de 14 cm de diamètre contenant le milieu de sélection YPD+Généticine+Nourséothricine. L'autre moitié, destinée à être sélectionnée en présence de CPT, a vu sa durée de sporulation prolongée d'un jour. Un aliquot de chaque milieu de sporulation a au préalable été analysé pour déterminer le taux de sporulation. Celui-ci variait de 0,35 à 2% selon les croisements, avec une moyenne proche des 0,5% envisagés.

En absence de camptothécine, après 30 heures à 30°C, les premiers clones sont apparus sur les boîtes du crible et sur la boîte « contrôle positif » *RAD53-DL rad9Δ* : de « gros » clones correspondant aux diploïdes exprimant la cassette de résistance à la nouséothricine, et des

clones plus petits, supprimeurs en puissance de *RAD53-DL*. La croissance a alors été suivie heure par heure, et les clones pointés au marqueur tant que la boîte *RAD53-DL ura2Δ* servant de témoin de la croissance résiduelle restait vierge de toute colonie (hormis les diploïdes susmentionnés). Au bout de 48 heures, les colonies *RAD53-DL ura2Δ* commençaient à pousser, marquant la fin de notre campagne de pointage (**figure RI 8**).

Le crible en présence de camptothécine, réalisé 24 heures après le début du premier, a nécessité moins de précautions, la drogue supprimant presque entièrement le bruit de fond pour la boîte contrôle *RAD53-DL ura2Δ* (**figure RI 8B**). En comparant groupe à groupe les boîtes de sélection avec ou sans camptothécine, moins de supprimeurs potentiels étaient visibles sur CPT, reflet de la plus grande stringence de la sélection en présence de stress génotoxique.

En plus de nous aider à définir la fenêtre temporelle d'isolement des supprimeurs, les contrôles *RAD53-DL rad9Δ* et *RAD53-DL ura2Δ* ont donné des résultats plus que satisfaisants. Ainsi, la boîte *RAD53-DL rad9Δ* est couverte de colonies, avec ou sans camptothécine, là où la boîte *RAD53-DL ura2Δ* sans stress génotoxique ne laisse apparaître que la croissance résiduelle de BLT15, et seulement quelques diploïdes en présence de camptothécine.

Enfin, la boîte de sélection des clones *RAD53-DL ura2Δ* en présence de doxycycline, qui permet d'estimer le nombre maximal de clones détectables, comptait plusieurs milliers de colonies, proche des 10000 théoriquement attendues.

5. Analyse du crible

5.1 Vérification de la suppression de *RAD53-DL*

5.1.1 Test de croissance en gouttes

Environ 2000 colonies ont été identifiées comme supprimeurs potentiels. Elles ont toutes été repiquées sur milieu riche contenant de la généticine, de la nouséothricine et de la doxycycline, pour les conserver au mieux en vue des analyses futures. Leur capacité à pousser en absence de méthionine ou de lysine a été analysée, et toutes les cellules prototrophes pour ces 2 acides aminés, en tant que potentiels diploïdes, éliminées.

Les quelques 1500 souches restantes ont alors été systématiquement testées en spotting et leur croissance en absence de doxycycline comparée à celle de BLT15 (**figure RI 9**). Cette méthode d'analyse très fine a révélé trois types de souches. Tout d'abord, des souches dont la croissance est similaire à celle de BLT15, faux supprimeurs issus de la croissance résiduelle. Ensuite, des souches dont la croissance est plus ou moins améliorée par rapport au contrôle ; on a ainsi une gamme de suppression de la toxicité de *RAD53-DL* qui est le reflet de l'apparition plus ou moins rapide des colonies sur les boîtes de sélection du crible – sans oublier néanmoins que certaines mutations affectent la croissance même en présence de doxycycline. Enfin, un grand nombre de supprimeurs présente une croissance tout à fait comparable à celle d'une souche sauvage, que ce soit en absence ou en présence de doxycycline, comme si la délétion qu'ils renferment pouvait abolir complètement la toxicité de *RAD53-DL*. Des supprimeurs réellement trop beaux pour être vrais, au sein desquels une mutation a très probablement inactivé *RAD53-DL*.

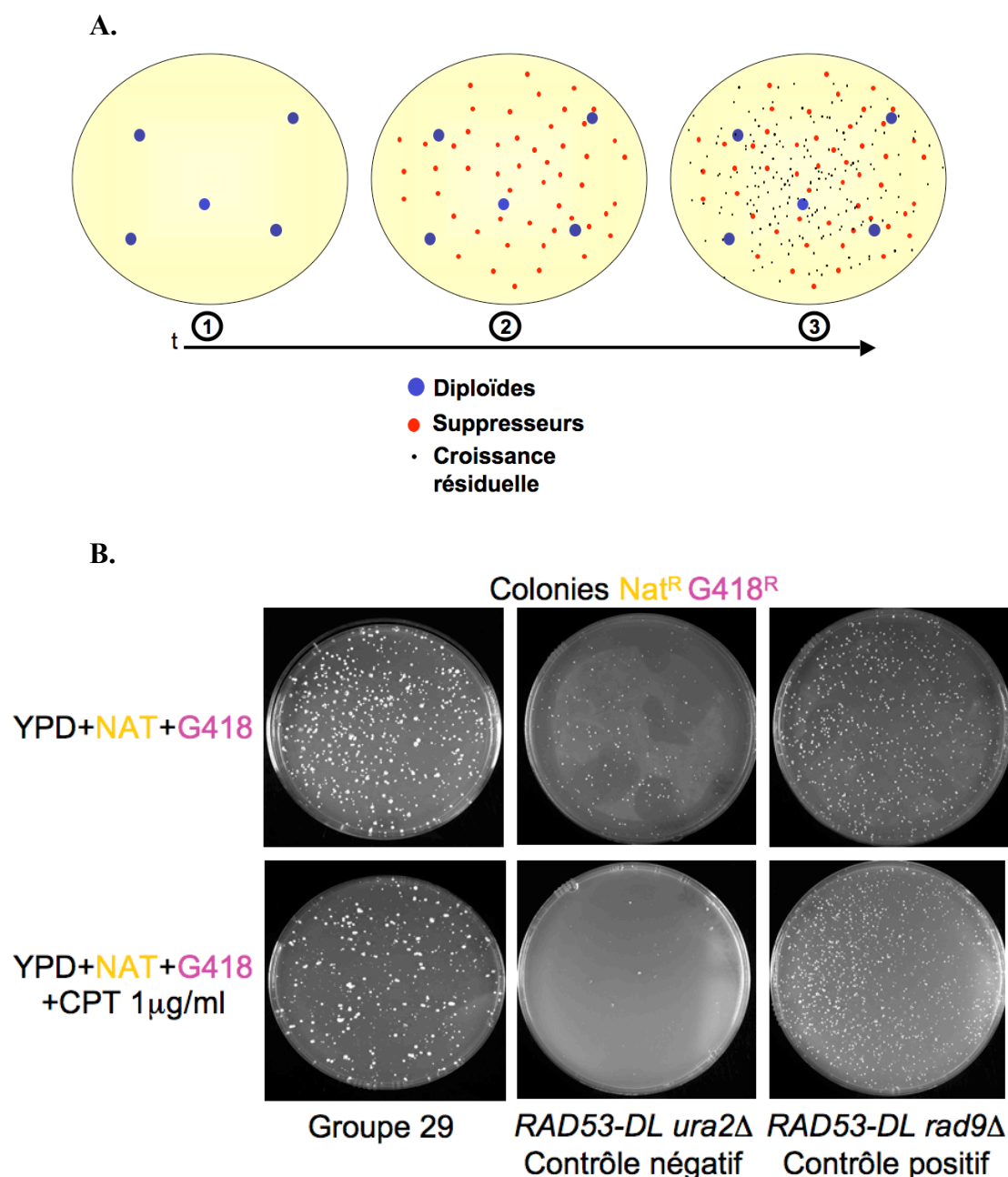


Figure RI 8. Résultats du crible

A. Le crible comme si vous y étiez ! Représentation schématique de l'apparition des colonies sur les boîtes du crible au cours du temps. Les diploïdes résistant à la nouséothricine apparaissent les premiers, suivis des supresseurs potentiels de la toxicité de *RAD53-DL* puis des colonies issues de la croissance résiduelle.

B. Résultats du crible. Le pool de délétants n°29 illustre les boîtes obtenues à la fin du crible avec et sans camptothécine. Les boîtes « contrôle » sur lesquelles avaient été étalées les cellules issues des croisements BLT15xBY4741 *ura2Δ* (contrôle négatif) ou BLT15xBY4741 *rad9Δ* (contrôle positif) sont également présentées.

5.1.2 Expression de Rad53-DL

Nous avons profité de la présence de la GFP comme constituant de Rad53-DL pour vérifier par microscopie à fluorescence son expression et ainsi discriminer les vrais supresseurs des révertants. Conformément à nos attentes, aucun signal GFP n'est détecté pour les souches à la croissance similaire à une souche sauvage. Au contraire, un fort signal nucléaire correspondant à Rad53-DL est visible pour les « vrais » supresseurs (**figure RI 9**).

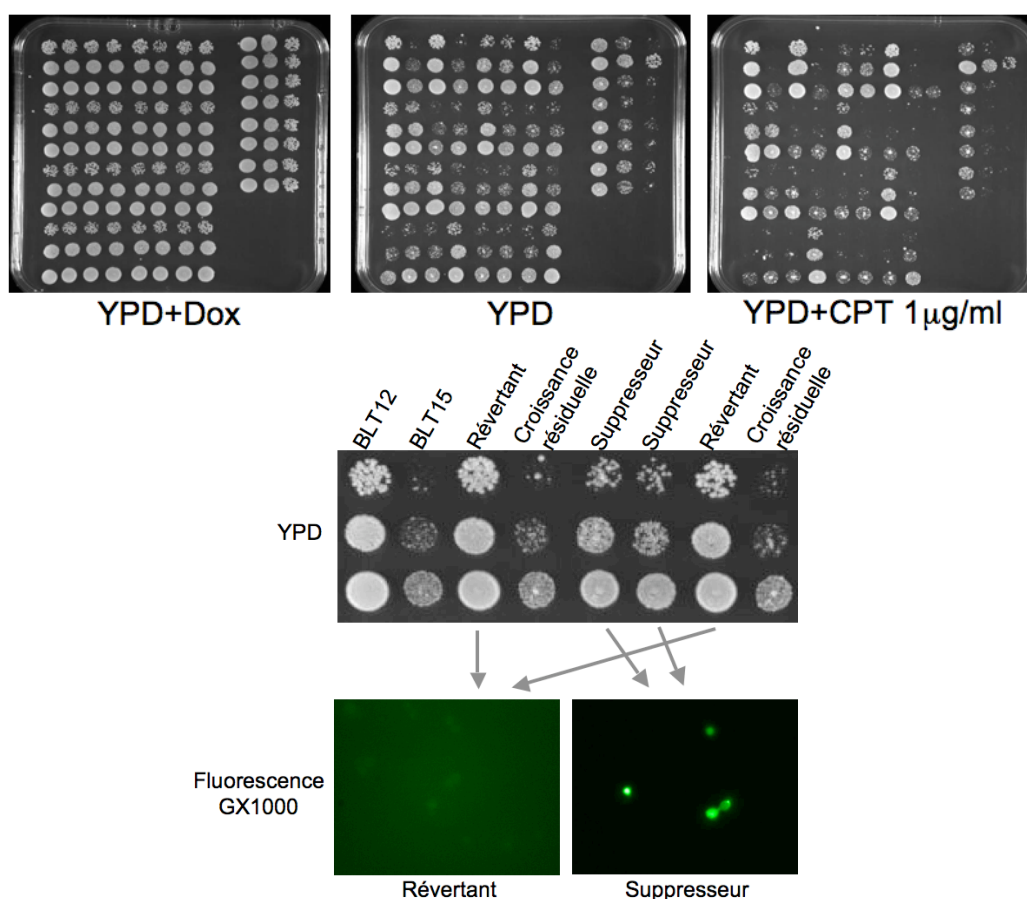


Figure RI 9. Vérification de la suppression de la toxicité de *RAD53-DL*

Des dilutions sériées des souches BLT12, BLT15 et de différents supresseurs ont été spottées sur milieu YPD en présence (+Dox) ou en absence de doxycycline, et en présence de CPT (1µg/mL). Les cellules ont été incubées 2 jours à 30°C. L'effet supresseur des 1500 souches isolées lors du crible a ainsi été systématiquement testé.

Trois types de souches ont été détectés : des supresseurs, des révertants et des souches présentant un croissane similaire à celle de BLT15 en absence de doxycycline, issues de la croissance résiduelle. Les révertants ont été discriminés des vrais supresseurs par la visualisation directe de Rad53-DL par microscopie à fluorescence grâce à son étiquette GFP (grossissement X1000).

5.1.3 Sur l'influence de la camptothécine

La suppression de la toxicité de *RAD53-DL* en présence de camptothécine a également été évaluée (**figure RI 9**). Tous les supresseurs issus du crible avec camptothécine améliorent également la croissance de BLT15 en absence de stress génotoxique. Mais même si aucun supresseur n'est camptothécine-spécifique, l'effet de la drogue n'est pas seulement « linéaire », c'est à dire lié à la seule augmentation de l'activation de *RAD53-DL* dans ces conditions (**figure RI 4C**). Dans la majorité des cas l'amélioration de la croissance observée sur milieu riche est bien amoindrie en présence de camptothécine (pourtant à une dose très faible, 1µg/mL, n'affectant pas la croissance d'une souche sauvage), mais cette réduction n'est pas toujours proportionnelle au degré de suppression. Elle est parfois minime, ou au contraire totale. Certains très bons supresseurs sans CPT sont ainsi pratiquement incapables de supprimer la toxicité de *RAD53-DL* en présence de la drogue (nous avons bien sûr vérifié que ces supresseurs ne sont pas eux mêmes sensibles à la CPT). Il semble donc que la camptothécine induise certains stress particuliers permettant de mettre en lumière des rôles et

des interactions spécifiques de Rad53. En cela, le crible avec camptothécine apporte réellement une information supplémentaire, qui reste certes difficile à interpréter.

5.2 Identification des gènes suppresseurs

Après un nouveau test comparatif de croissance en spotting, 215 suppresseurs ont été validés, allant d'une très faible à une très bonne suppression de la toxicité de *RAD53-DL* démontrant une bonne couverture et représentativité du crible. L'identification des gènes inactivés au sein de ces souches est rendue aisée par la présence des 2 étiquettes de 20pb situées en amont et en aval de la cassette de résistance KANMX4 et spécifiques de chaque délétion. Pour maximiser l'efficacité des réactions de séquençage, la partie 5' de la cassette de délétion comprenant l'étiquette amont (UPTAG) a été amplifiée par PCR sur colonie pour chacun des 215 suppresseurs, puis a servi de matrice pour le séquençage (**figure RI 10**).

En comparant la séquence UPTAG obtenue avec la base de données disponible sur le site du Saccharomyces Genome Deletion Project, on obtient alors – grand moment – le nom du gène invalidé.

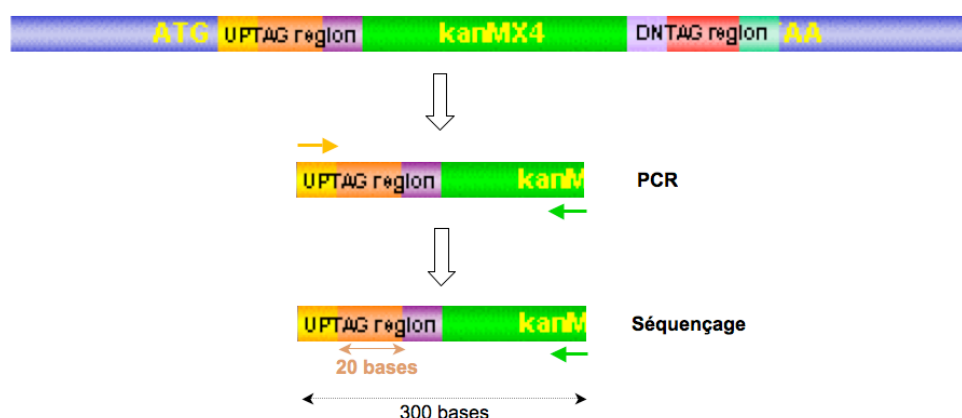


Figure RI 10. Identification des suppresseurs

La partie 5' de la cassette de délétion comprenant l'étiquette amont (UPTAG) a été amplifiée par PCR sur colonie pour chacun des 215 suppresseurs (grâce aux amorces 5' et 3' figurées respectivement par les flèches orange et verte), puis a servi de matrice pour le séquençage de l'étiquette UPTAG de 20pb (à l'aide de l'amorce figurée par la flèche verte).

6. Résultats du crible de suppression de *RAD53-DL*

Les résultats du séquençage sont présentés dans le **tableau RI 1** à la fin de ce chapitre. 190 suppresseurs sur les 215 ont été identifiés, correspondant à 110 gènes différents. Près du tiers des suppresseurs ont été retrouvés plus d'une fois, parmi lesquels *RAD9*, ce qui a validé notre approche et confirmé l'efficacité du crible.

60% des suppresseurs proviennent du crible réalisé sans stress génotoxique, 30% du crible avec camptothécine, plus stringent. Seuls 10% des suppresseurs ont été retrouvés à la fois en présence et en absence de camptothécine, mais leur degré de suppression de la toxicité de *RAD53-DL* n'est pas nécessairement le plus élevé. Aussi, même si le nombre d'occurrences associé au niveau de suppression de la toxicité de *RAD53-DL* et à l'influence de la camptothécine renseignent sur l'importance du suppresseur identifié, il semble difficile de juger *a priori* de la « pertinence » d'un suppresseur vis à vis de Rad53. *RAD9* n'a par exemple été identifié qu'à 2 reprises, et le mutant *rad9Δ* ne figure pas parmi les meilleurs suppresseurs de *RAD53-DL*. Difficile pourtant de remettre en cause son importance dans la voie des

checkpoints de l'ADN. Aussi précieuses soient-elles, ces informations doivent donc être complétées par une analyse approfondie des données de la littérature, afin d'évaluer le rôle éventuel de chaque suppresseur au sein de la voie des checkpoints de l'ADN. De plus, il est crucial d'identifier des réseaux d'interaction permettant de relier les différents suppresseurs entre eux et de décrypter le mécanisme à l'origine de la suppression de *RAD53-DL*.

6.1 Analyse des bases de données et groupes fonctionnels

La quantité d'informations fournies par les bases de données est proprement gigantesque. Outre, évidemment, la fonction d'un gène donné, sa séquence, les phénotypes du mutant, les caractéristiques physico-chimiques de la protéine encodée, etc., elles recensent également toutes les interactions génétiques et physiques connues. Constamment alimentées par des cribles à haut débit toujours plus sensibles, ces dernières permettent de construire facilement le réseau d'interaction du gène d'intérêt. Le site <http://string.embl.de/> propose par exemple de visualiser ces interactions de façon particulièrement rapide, pratique et esthétique.

Nous poursuivons deux buts : premièrement, rapprocher les suppresseurs avec la voie des checkpoints et, plus généralement, avec la réponse aux dommages de l'ADN. Dans cette optique, en plus de la fonction du suppresseur, ses éventuelles interactions génétiques ou physiques avec des composants de la DDR, ou encore des phénotypes de sensibilité aux stress génotoxiques, ont été tout particulièrement surveillés. Deuxièmement, il nous faut rapprocher les gènes suppresseurs entre eux ; de la même façon, l'analyse de leurs interactions génétiques et physiques est venue compléter les données fonctionnelles disponibles. L'étude des bases de données disponibles pour *S. cerevisiae* (principalement Saccharomyces Genome Database : www.yeastgenome.org/ et YPD : <https://www.proteome.com/proteome/>) a ainsi permis d'établir une première classification et de rassembler de nombreux gènes au sein de groupes fonctionnels (**tableau RI 1**). 30% des suppresseurs n'ont pas de fonction connue, soit autant de nouveaux acteurs potentiels de la voie des checkpoints de l'ADN. Les autres gènes sont impliqués dans diverses fonctions cellulaires telles que le remodelage de la chromatine, la réponse au stress ou la transcription (**tableau RI 2**), suggérant un large spectre d'action de Rad53. Notre crible a également isolé plusieurs voies de signalisation et des complexes protéiques déjà décrits mais qui n'avaient jamais été reliés à Rad53 jusqu'alors. Quelques exemples sont détaillés ci-dessous.

Enfin, en comparant nos suppresseurs avec les membres du réseau d'interactions physiques de Rad53 (voir **figure I 12**), nous n'avons identifié aucun facteur commun. Ce qui démontre la complémentarité des approches « interactions génétiques » et « interactions physiques » (ou alors que nous avons isolé n'importe quoi !). Des interactions labiles ou se produisant uniquement sous certaines conditions pourraient ainsi être révélées plus facilement *in vivo* par une approche génétique.

6.1.1 Voie HOG du stress osmotique

Le gène *PBS2*, qui code une MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) kinase impliquée dans le stress osmotique, représente à lui seul le cinquième des suppresseurs ! La cible de Pbs2, la MAPK Hog1, a également été retrouvée 7 fois dans le crible. *SSK1*, un troisième composant de cette voie de transduction, fait lui aussi partie des suppresseurs (pour une revue sur la voie HOG de réponse au stress osmotique, (Hohmann, 2002)) (**figure RI 11A**).

Les liens entre la voie HOG et les checkpoints de l'ADN semblent donc particulièrement dignes d'intérêt. Rad53 et Hog1 ont d'ailleurs déjà fait l'objet d'une étude commune en

réponse au peroxyde d'hydrogène, un stress oxydatif qui entraîne la phosphorylation des deux protéines (Haghnazari & Heyer, 2004). Cette étude a cependant conclu à l'indépendance des 2 voies dans ce contexte.

On peut remarquer que ces 2 voies de transduction, qui impliquent majoritairement des protéines kinases, sont régulées par des phosphatases communes, en particulier Ptc2 et Ptc3 (Leroy et al, 2003; Saito & Tatebayashi, 2004), médiateurs possibles d'une interconnexion entre les 2 voies. Une autre hypothèse, moins favorable, serait qu'en absence de Pbs2 ou Hog1, Ptc2 et Ptc3, libérées de deux de leurs substrats, pourraient plus fortement inactiver *RAD53-DL* et donc supprimer, en partie, sa toxicité. Une suppression artefactuelle, sans réelle existence physiologique. Tester si la délétion de *PTC2/PTC3* dans les souches *RAD53-DL hog1Δ* ou *RAD53-DL pbs2Δ* abolie la suppression de *RAD53-DL* répondrait à cette question.

Quoiqu'il en soit, *HOG1* a été le premier suppresseur identifié. Et c'est sans attendre, sans *a priori*, que nous avons commencé son étude. La croissance de la souche BLT15 a tout d'abord été testée en présence de doses croissantes de NaCl ou de sorbitol, induisant un stress osmotique. Nous avons observé que l'expression de *RAD53-DL* sensibilise les cellules à ces deux stress (**figure RI 11B**). Nous avons alors mesuré l'activation de Rad53/Rad53-DL en présence d'un stress osmotique, et observé une suractivation de *RAD53-DL* suite à l'addition de NaCl. De plus, cette suractivation dépend de *HOG1* (**figure RI 11C**).

Catégorie	Nombre de gènes
Réponse aux dommages de l'ADN	2
Régulation du cycle cellulaire	2
Remodelage de la chromatine	7
Signalisation	3
Réponse au stress	5
Transcription	5
Métabolisme des ARNm	6
Export des ARNm	2
Structure cellulaire	3
Trafic intracellulaire	3
Repliement des protéines	2
Protéasome	3
Métabolisme cellulaire	18
Métabolisme mitochondrial	8
Autres	11
Fonction inconnue	30

Tableau RI 2. Répartition des suppresseurs selon leur fonction cellulaire

Une littérature documentant les dommages de l'ADN induits par le sel existe, notamment pour les cellules de mammifères exposées à des milieux hypertoniques (par exemple, (Dmitrieva et al, 2004)). Avant d'aller plus loin, un point, cependant, a attiré notre attention : dans ces expériences, contrairement à Rad53-DL, la protéine endogène Rad53 ne semble pas affectée par l'ajout de sel. Le Dr A. Peyroche a alors suggéré que l'opérateur TetO contrôlant l'expression de *RAD53-DL* pourrait être affecté par la présence de NaCl. Hypothèse immédiatement testée et... vérifiée en transformant une souche sauvage et une souche *hog1Δ* avec le plasmide pCM183-GFP (c'est à dire portant le gène codant la GFP placé sous le contrôle de l'opérateur tétracycline TetO). Dans ces conditions, en effet, l'ajout de NaCl induit

l'expression de la protéine GFP, et ce dans les mêmes proportions que l'absence de doxycycline (l'absence de doxycycline conjuguée à la présence de sel n'augmentant pas l'expression de la GFP, il semble que l'un ou l'autre de ces stimuli, aux concentrations utilisées, soit suffisant pour atteindre le niveau maximal d'expression permis par l'opérateur TetO). De plus, comme pour *RAD53-DL*, l'effet du sel est aboli en absence de Hog1 (**figure RI 11D**).

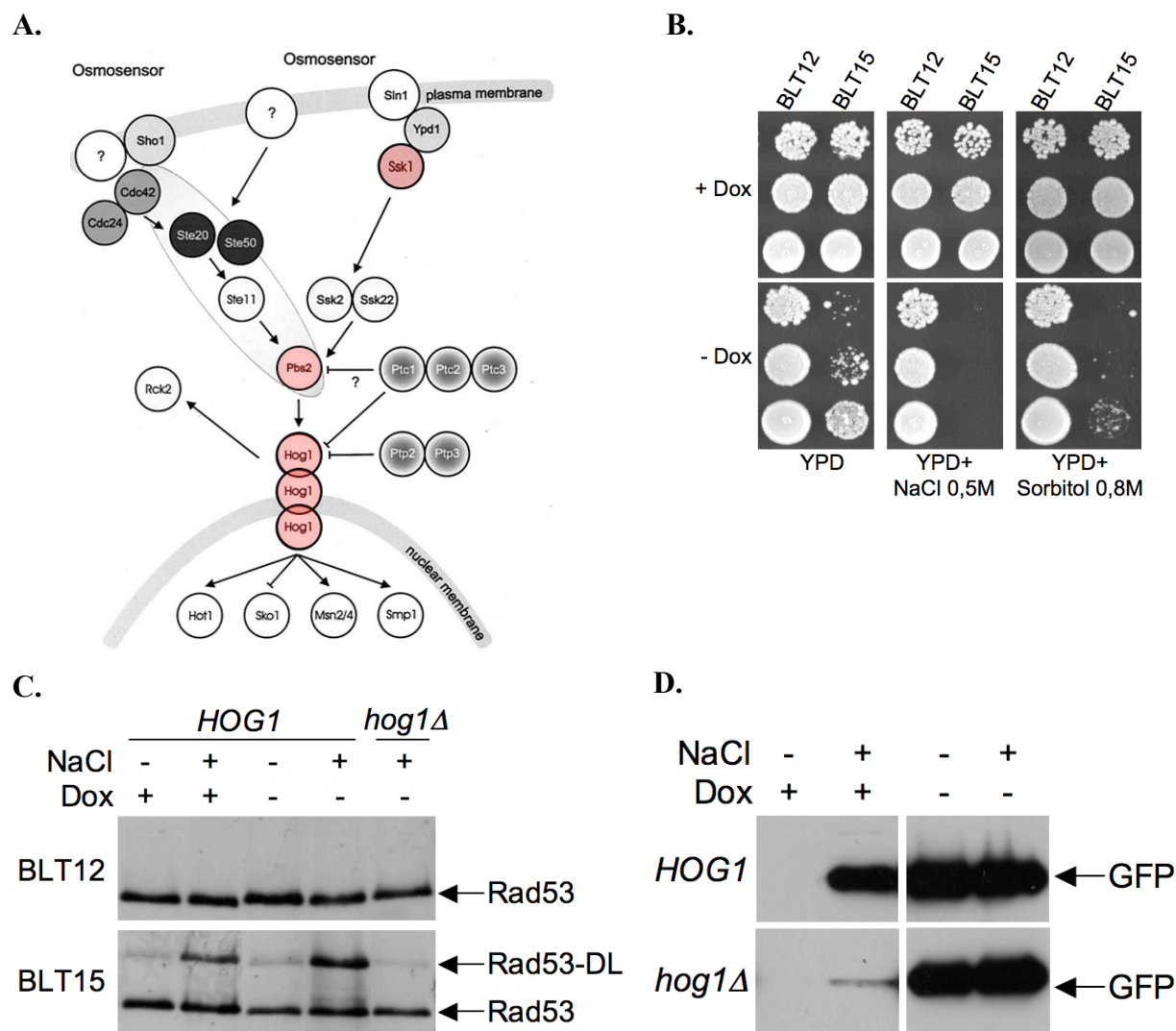


Figure RI 11. *RAD53-DL* et la voie HOG de réponse au stress osmotique

A. Schéma de la voie HOG de réponse au stress osmotique. Adapté de (Hohmann, 2002). Les gènes *SSK1*, *PBS2* et *HOG1* (en rouge) ont été identifiés dans le crible de suppression de la toxicité de *RAD53-DL*.

B. Sensibilité de BLT15 au stress osmotique. Des dilutions sérielles des souches BLT12 et BLT15 ont été spottées sur des boîtes contenant le milieu de culture YPD seul ou additionné de NaCl (0,5M) ou de sorbitol (0,8M) en conditions permissives (+Dox) ou en conditions restrictives (-Dox). Les cellules ont été incubées 2 jours à 30°C.

C. Induction de Rad53-DL en réponse au stress osmotique. Des extraits protéiques totaux réalisés à partir de souches BLT12, BLT15, *hog1Δ* et *RAD53-DL hog1Δ* cultivées en conditions permissives (+Dox) ou restrictives (-Dox), en absence (-) ou en présence (+) de NaCl (0,75M) ont été analysés par Western blot avec des anticorps anti-Rad53.

D. Induction de la GFP en réponse au stress osmotique et à la doxycycline. Des extraits protéiques totaux réalisés à partir de souches sauvages *HOG1* ou mutante *hog1Δ* transformées avec le plasmide pCM183-GFP et cultivées en absence (-) ou en présence (+) de doxycycline et de NaCl (0,75M) ont été analysés par Western blot avec des anticorps anti-GFP.

Le crible de suppression de la toxicité de *RAD53-DL* n'a bien entendu pas été effectué en présence de 1M NaCl. Il n'empêche, ces observations nous ont fait attendre le résultat des autres réactions de séquençage avec encore plus d'impatience.

6.1.2 Métabolisme de l'ARN

Plusieurs suppresseurs forment un groupe cohérent ayant trait au métabolisme des ARN messagers.

6.1.2.1 Nonsense-mediated mRNA decay

Le nonsense-mediated mRNA decay (NMD) est un mécanisme de surveillance qui reconnaît et dégrade rapidement les ARNm contenant des codons stop prématurés (Baker & Parker, 2004). Il régule également une fraction importante du transcriptome (He et al, 2003). Les trois composants majeurs du NMD chez *S. cerevisiae*, *NAM7* (*UPF1*), *NMD2* (*UPF2*) et *UPF3* ont été identifiés dans notre crible. De même que l'absence de l'une ou l'autre de ces trois protéines entraîne les mêmes perturbations du taux de dégradation des ARNm, la suppression de toxicité de *RAD53-DL* dans les souches *nam7Δ*, *nmd2Δ* et *upf3Δ* est identique (**figure RI 12A**). Il semble donc que l'inactivation du NMD soit à l'origine de la suppression de la toxicité de *RAD53-DL*.

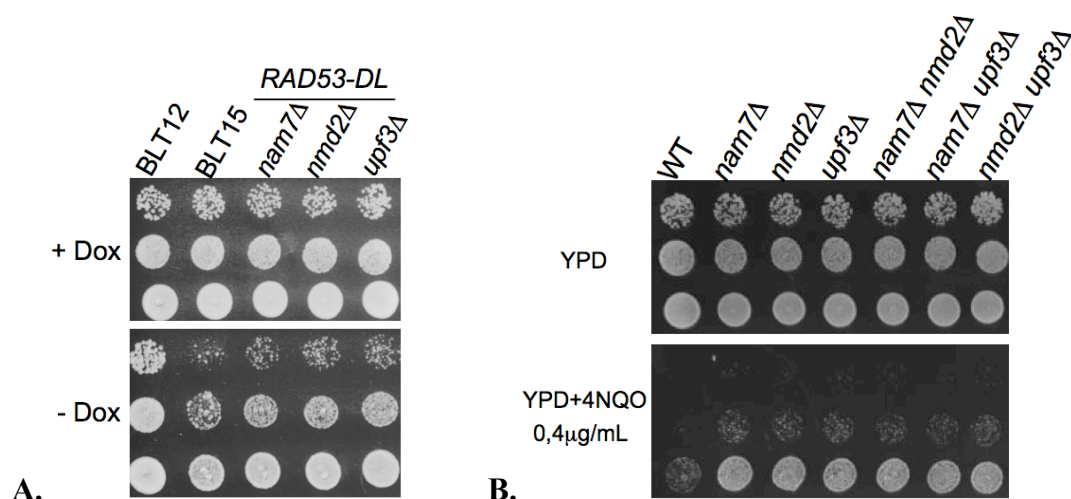


Figure RI 12. Effet suppresseur de *RAD53-DL* et résistance au stress génotoxique des mutants du NMD

A. Suppression de la toxicité de *RAD53-DL* par les mutants du NMD. Des dilutions sériées des souches BLT12, BLT15, *RAD53-DL nam7Δ*, *RAD53-DL nmd2Δ* et *RAD53-DL upf3Δ* ont été spottées sur milieu YPD en conditions permissives (+Dox) ou restrictives (-Dox). Les cellules ont été incubées 2 jours à 30°C.

B. Résistance au 4NQO des mutants du NMD. Des dilutions sériées des souches sauvage (WT, wild type), *nam7Δ*, *nmd2Δ*, *upf3Δ* et des différentes combinaisons de double mutants ont été spottées sur milieu YPD seul ou additionné de 4NQO (0,4μg/mL). Les cellules ont été incubées 2 jours à 30°C.

Chez les eucaryotes supérieurs, l'état de phosphorylation d'Upf1, crucial pour le NMD, est finement régulé (Stettler et al, 1993; Page et al, 1999). Une étude récente a démontré que les protéines Upf1 et Upf2 de *S. cerevisiae* sont des phosphoprotéines (Wang et al, 2006). Cependant, alors que les protéines responsables de la phosphorylation et de la déphosphorylation d'Upf1 sont connues aussi bien chez l'Homme que chez le nématode, ces facteurs n'ont pas encore été identifiés chez la levure. Parmi les candidats, les phosphatidylinositol-3-related kinases (PI3-kinases) Mec1 et Tel1. Il a d'ailleurs été montré qu'hUpf1 est phosphorylée *in vitro* et *in vivo* par ATR (l'homologue de Mec1 chez l'Homme)

et qu'il est nécessaire à la stabilité du génome, mais ce de façon curieusement indépendante de son rôle dans le NMD (Azzalin & Lingner, 2006).

Enfin, parmi les gènes de levure dont l'expression est contrôlée au niveau post-transcriptionnel par le NMD, plusieurs sont impliqués dans les checkpoints (*TEL1*, *MEC3*) ou la réparation de l'ADN (*RAD1*, *YKU70*) (He et al, 2003). Chez la drosophile, ATM est également régulé par le NMD (Rehwinkel et al, 2005). Les checkpoints de l'ADN comme cibles du NMD, ou bien le NMD comme cible des checkpoints de l'ADN ?

6.1.2.2 Polyadénylation de l'ARN

Le gène *PAB1*, codant la protéine de liaison à la queue poly(A) des ARNm (Sachs et al, 1986), est un suppresseur multicopie de *RAD53-DL* (A. Peyroche, données non publiées). Notre crible a isolé trois gènes, *SXM1*, *PBP1* et *PAN2* liés au mécanisme de polyadénylation des pré-ARNm. *Sxm1* est un transporteur nucléaire de type karyophérine qui assure l'import nucléaire de Pab1 (Brune et al, 2005). *Pbp1* est un facteur de contrôle de la polyadénylation qui régule négativement Pab1, avec lequel il interagit en double-hybride (Mangus et al, 1998). Enfin, *Pan2* est la sous-unité catalytique du complexe poly(A)-ribonucléase PAN dont l'activité de déadénylation dépend de Pab1 (Sachs & Deardorff, 1992).

PAN2, identifié 7 fois dans notre crible, a également été impliqué dans la DDR, plus précisément dans la réponse au blocage de la réplication. Le complexe PAN contribue, avec la protéine kinase Dun1, à la régulation post-transcriptionnelle du gène de réparation de l'ADN Rad5 (Hammet et al, 2002). Dans le modèle proposé, l'absence de *DUN1* et de *PAN2* empêche le maintien de l'activation du checkpoint de la phase S. Ce mécanisme est probablement à l'origine de la suppression de *RAD53-DL*.

6.1.2.3 NMD et polyadénylation

Le rôle de Pab1 dans le NMD est âprement discuté, certains lui attribuant un rôle-clé permettant de discriminer les codons STOP prématurés des « vrais » codons STOP chez la levure (Amrani et al, 2004), alors que d'autres le trouvent parfaitement dispensable au NMD (Meaux et al, 2008).

Des liens complexes mais étroits existent donc entre le NMD et la maturation des ARN messagers (**figure RI 13**). Il serait intéressant de déterminer (par des tests d'épistasie, voir ci-dessous) si la suppression de *RAD53-DL* par les mutants du NMD et ceux de la polyadénylation des ARNm dépend d'un mécanisme commun, avant d'étudier plus avant les relations éventuelles entre Rad53 et le métabolisme des ARN messagers. Tester *a posteriori* l'effet suppresseur des autres membres de ce réseau d'interaction permettrait également de renforcer l'intérêt d'une telle étude.

6.1.3 *OCA1*, *YHL029C* et *YCR095C*

Des interactions physiques entre *Oca1*, *Yhl029c* et *Ycr095c* ont été détectées à la fois au sein de cribles double-hybride (Ito et al, 2001) et de purification par affinité couplée à une analyse par spectrométrie de masse (Gavin et al, 2006). De plus, les 3 gènes ont été identifiés dans un crible génétique comme étant nécessaires à la réplication du virus de la mosaïque du brome chez *S. cerevisiae* (Kushner et al, 2003). *Oca1* ressemble à une tyrosine phosphatase, et présente 2 homologues chez *S. cerevisiae*, *Siw14* et *Ynl056w*. *Ycr095c* est également un membre de la famille des tyrosine phosphatases, et partage 23% d'identité avec *Oca1*, 25% avec *Siw14*. La protéine *Oca1* est impliquée dans l'arrêt du cycle cellulaire en G1 en réponse

au stress oxydant (Alic et al, 2001). Les checkpoints de l'ADN sont également activés suite à un stress oxydant (Leroy et al, 2001), mais des interconnexions avec la voie OCA1 restent à révéler.

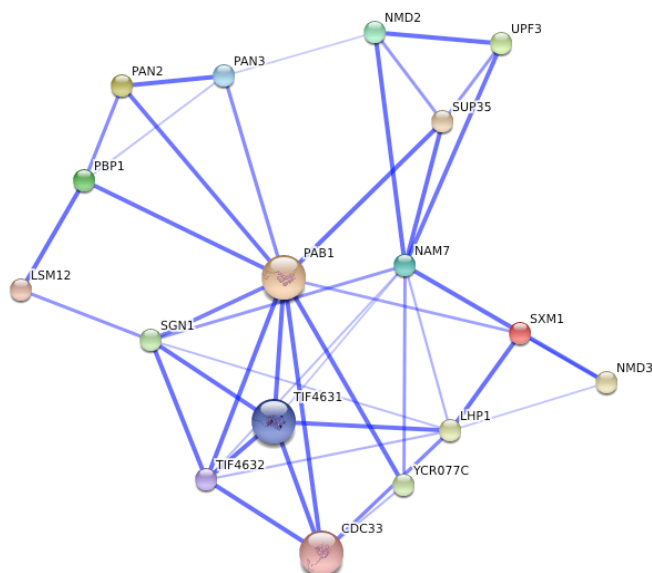


Figure RI 13. Interactions entre le NMD et la polyadénylation des ARN. Réalisé sur <http://string.embl.de/>

L'épaisseur du trait reliant 2 gènes rend compte de la probabilité de l'interaction.

6.1.4 Protéasome

Trois gènes codant des composants de la voie du protéasome figurent parmi les supprimeurs : *UMPI*, *PRE9* et *SEMI*. Ce groupe comprend en fait la quasi-totalité des gènes du protéasome susceptibles d'être isolés dans notre crible, l'écrasante majorité des gènes codant les sous-unités du protéasome étant essentiels. Les liens entre le protéasome et la réponse aux dommages de l'ADN sont discutés dans la... discussion.

6.1.5 Conclusion

L'étude conjointe de la littérature et des bases de données disponibles pour *S. cerevisiae* a permis d'identifier plusieurs réseaux d'interactions et de répartir plusieurs gènes en groupes fonctionnels. Ces groupes nous renseignent sur le possible mécanisme à l'origine de la suppression de *RAD53-DL* et donc sur l'approche à adopter pour analyser ce mécanisme. Surtout, ils permettent d'évaluer l'intérêt d'une telle analyse.

D'autres supprimeurs ont été rassemblés sur la base d'un processus cellulaire « général » commun, tels que la transcription, l'activité mitochondriale... Les liens qui les unissent sont beaucoup plus lâches, le mécanisme à l'origine de la suppression de *RAD53-DL* probablement différent pour chaque suppresseur. Enfin, comme dans tout crible, plusieurs gènes avec des fonctions aussi diverses qu'inattendues ont été isolés. Leur pertinence physiologique n'en est pas nécessairement moindre, mais la stratégie à envisager pour leur étude est peu évidente. Les bases de données étant en constante évolution, des interactions entre ces différents supprimeurs ne manqueront pas de se faire jour.

En attendant, deux possibilités s'offrent à nous : soit étudier spécifiquement un des groupes fonctionnels, soit pousser plus avant l'analyse de la totalité des supprimeurs à travers des cribles secondaires pour (i) déterminer leur implication dans la voie de réponse aux dommages à l'ADN, (ii) identifier de nouvelles interactions permettant de définir de

nouveaux groupes fonctionnels et (iii) définir leurs interactions avec Rad53. Nous avons choisi de continuer dans un premier temps l'analyse globale de tous les supprimeurs.

6.2 Analyse phénotypique des supprimeurs et implication des supprimeurs dans la voie de réponse aux dommages de l'ADN

6.2.1 Test de sensibilité des supprimeurs au 4NQO, à la camptothécine et à l'hydroxyurée

Les 110 supprimeurs identifiés dans notre crible, en tant qu'activateurs ou cibles potentiels de Rad53, semblent par là-même impliqués dans la réponse au stress génotoxique. Cependant, la suppression de *RAD53-DL* peut être due à des mécanismes difficiles à décrypter, voire à des effets tout à fait indirects. Partant du principe que l'absence d'un gène impliqué dans la réponse à un stress donné entraîne une modification de la sensibilité à ce stress, nous avons testé la sensibilité de chaque suppresseur, **en absence de *RAD53-DL***, à trois agents génotoxiques : la CPT, le 4NQO et l'hydroxyurée (HU). Comme nous l'avons souligné au cours de l'introduction, un stress génotoxique spécifique entraîne une réponse cellulaire spécifique, impliquant seulement les protéines appropriées. En testant un panel de 3 drogues provoquant différents types de dommages de l'ADN et donc différentes réponses (pour mémoire, l'hydroxyurée ralentit les fourches de réplication, la CPT provoque des cassures double-brin de l'ADN et le 4NQO modifie les bases de l'ADN (Friedberg et al, 2005)), nous pouvons révéler l'implication de protéines participant aussi bien à une seule qu'à plusieurs voies de la DDR. Précisons enfin que ces 3 stress génotoxiques affectent évidemment tous la viabilité d'une souche *rad53Δ*. Les résultats sont présentés dans le **tableau RI 3**.

Pour une plus grande fiabilité, l'analyse phénotypique a été réalisée sur les mutants des 2 types sexuels de la banque de délétants. De manière générale, les mutants BY4741 et BY4742 présentaient le même comportement tant en croissance sur milieu riche qu'en présence de stress. Pour une dizaine de mutants, néanmoins, les phénotypes variaient d'une souche à l'autre. La reconstruction de la délétion incriminée, pour ces souches mais aussi pour tous les supprimeurs d'intérêt, est donc indispensable.

6.2.2 Tests d'épistasie et groupes fonctionnels

Un quart des supprimeurs ont montré une sensibilité différente de la souche sauvage à l'un au moins des stress génotoxiques testés. De façon surprenante, alors que l'on attendait plutôt une hypersensibilité aux dommages de l'ADN, la moitié de ces mutants sont apparus hyper-résistants au 4NQO et/ou à la CPT (**tableau RI 3**). C'est notamment le cas des trois mutants du NMD, *nam7Δ*, *nmd2Δ* et *upf3Δ*. Les 3 mutants du NMD sont non seulement tous hyper-résistants au 4NQO, mais ils présentent également le même niveau de résistance, retrouvé dans chaque combinaison de doubles mutants (**figure RI 12B**). Ces résultats sont compatibles avec le mode d'action supposé des 3 protéines du NMD sous forme de complexe : le NMD est inactivé si un seul de ses composants est absent (Baker & Parker, 2004).

Un raisonnement similaire suggère l'existence d'un complexe pour les 3 membres du groupe fonctionnel *OCA1/YCR095C/YHL029C*, dont les mutants respectifs sont tous hypersensibles au 4NQO, à la camptothécine et à l'hydroxyurée, et ce dans les mêmes proportions. Comme pour le NMD, nous avons vérifié cette hypothèse grâce à un test d'épistasie. Si, dans le cas de deux supprimeurs sensibles à un stress génotoxique, leur sensibilité ne s'additionne pas au sein d'un double-mutant, c'est qu'elle met en jeu une voie commune aux deux supprimeurs

étudiés. Les différentes combinaisons des mutants *oca1Δ*, *ycr095cΔ* et *yhl029cΔ* donnant à chaque fois le phénotype d'un des simples mutants, on peut effectivement penser que ces 3 protéines forment un complexe (**figure RI 14**). D'ailleurs, *YCR095C* et *YHL029C* ont récemment été rebaptisés *OCA4* et *OCA5* sur SGD.

ORF	Protéine	Sensibilité aux stress génotoxiques		
		4NQO	CPT	HU
<i>YDR217C</i>	Rad9	S	S	S
<i>YMR080C</i>	Nam7/Upf1	R	R	-
<i>YHR077C</i>	Nmd2/Upf2	R	R	-
<i>YGR072W</i>	Upf3	R	R	-
<i>YGL094C</i>	Pan2	R	-	-
<i>YGR178C</i>	Pbp1	n/a	n/a	n/a
<i>YDR395W</i>	Sxm1	R	R	-
<i>YNL099C</i>	Oca1	S	S	S
<i>YHL029C</i>	?	S	S	S
<i>YCR095C</i>	?	S	S	S
<i>YDR363W-A</i>	Sem1	R	R	S ?
<i>YGR135W</i>	Pre9	R	R	S ?
<i>YBR173C</i>	Ump1	R	R	S ?
<i>YLR021W</i>	?	R	R	S ?
<i>YPL144W</i>	?	R	R	S ?
<i>YLR199C</i>	?	R	R	S ?
<i>YKL206C</i>	?	R	R	S ?
<i>YBR272C</i>	Hsm3	R	R	S ?
<i>YPL055C</i>	Lge1	S	S	S
<i>YDR073W</i>	Snf11	R	-	-
<i>YOR189W</i>	les4	-	-	S
<i>YER092W</i>	les5	S	S	S
<i>YOR191W</i>	Ris1	-	-	-
<i>YOR279C</i>	Rfm1	S?	S?	S?
<i>YGL194C</i>	Hos2	S?	-	-
<i>YMR039C</i>	Sub1	S	S	S
<i>YPL139C</i>	Ume1	S	-	-
<i>YIL011W</i>	Tir3	R	-	-

Tableau RI 3. Sensibilité des supprimeurs au stress génotoxique

S : hyper-sensibilité. R : hyper-résistance. - : sensibilité similaire à celle d'une souche sauvage. n/a : non testé. Seuls les supprimeurs présentant une sensibilité différente de celle d'une souche sauvage à au moins un des stress génotoxiques testés figurent dans ce tableau

De la même façon, des tests d'épistasie ont été réalisés entre les différents mutants présentant un phénotype en présence de stress génotoxique pour révéler l'existence de voies fonctionnelles communes. En particulier, 5 supprimeurs de fonction inconnue (correspondant aux gènes *YLR021W*, *YPL144W*, *YLR199C*, *YKL206C* et *HSM3*) sont hyper-résistants à la fois au 4NQO et à la CPT, alors qu'ils semblent (très) légèrement sensibles à l'hydroxyurée, caractéristiques partagées, de façon surprenante, par les 3 mutants du protéasome *sem1Δ*, *pre9Δ* et *ump1Δ* (**figure RI 15**). En effet, c'est la première fois, à notre connaissance, qu'un tel phénotype est révélé pour ces mutants, le protéasome apparaissant dans la littérature comme un régulateur positif de la réponse aux dommages de l'ADN (voir discussion). La combinaison de chacun des 5 mutants « inconnus » avec chacun des 3 mutants du protéasome

n'a jamais révélé la moindre additivité de résistance au 4NQO (voir résultats). Ces 8 mutants appartiennent donc au même groupe d'épistasie concernant la réponse aux dommages de l'ADN. En d'autres termes, les gènes *YLR021W*, *YPL144W*, *YLR199C*, *YKL206C* et *HSM3* font partie de la voie du protéasome. Les interactions décrites dans les bases de données pour ces 5 gènes (interaction physique entre Ylr021w et Ypl144w (Krogan et al, 2006), entre Ylr199c et Ykl206c ou Ump1 (Krogan et al, 2006), ou entre Hsm3 et la majorité des sous-unités du 19S (Gavin et al, 2002)) ne disent pas le contraire. Le début d'une longue histoire. L'hyper-résistance au 4NQO est une caractéristique partagée par les mutants du protéasome et ceux du NMD, en plus de leur capacité à supprimer la toxicité de *RAD53-DL*. Il pourrait donc exister des interactions fonctionnelles entre le NMD et le protéasome (des tests d'épistasie permettraient de le déterminer). A ce titre, il est intéressant de noter qu'un crible génétique recherchant des gènes impliqués dans la dégradation d'ARNm dépourvus de codon stop a récemment isolé plusieurs mutants du protéasome (Wilson et al, 2007).

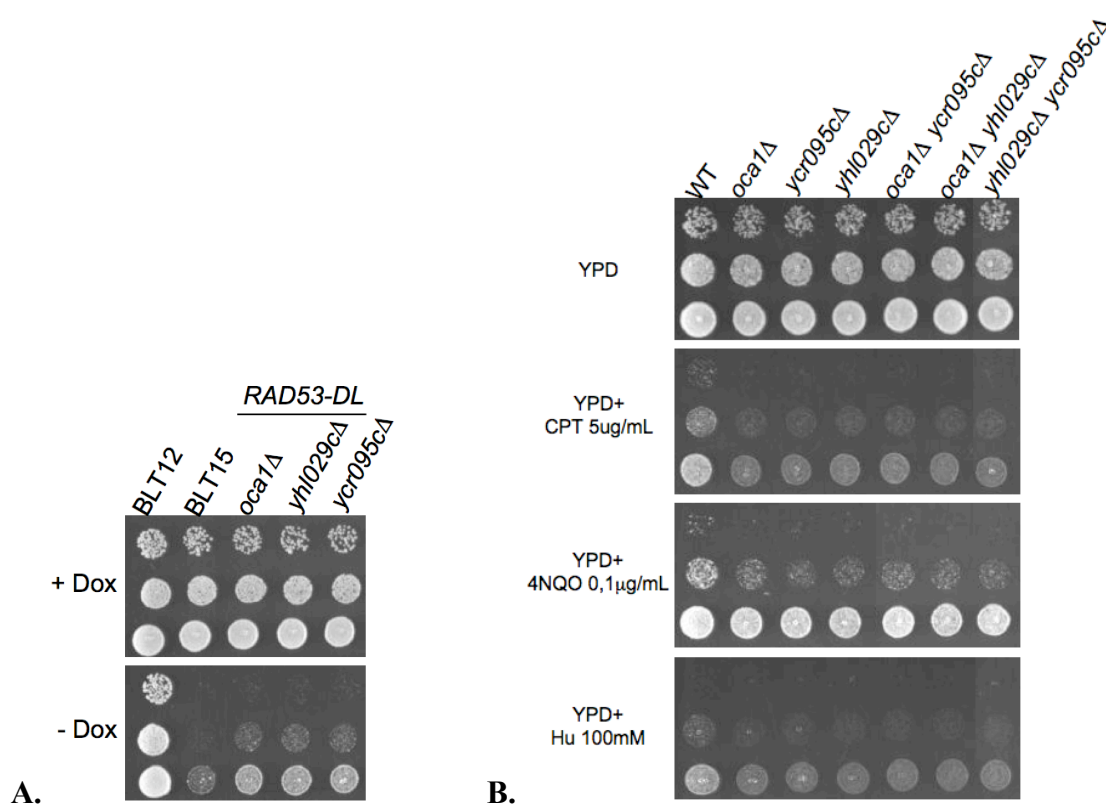


Figure RI 14. Effet suppresseur de *RAD53-DL* et sensibilité au stress génotoxique des mutants *oca1Δ*, *yhl029cΔ* et *ycr095cΔ*

A. Suppression de la toxicité de *RAD53-DL* par les mutants *oca1Δ*, *ycr095cΔ* et *yhl029cΔ*. Des dilutions sériées des souches BLT12, BLT15, *RAD53-DL oca1Δ*, *RAD53-DL yhl029cΔ* et *RAD53-DL ycr095cΔ* ont été spottées sur milieu YPD en conditions permissives (+Dox) ou restrictives (-Dox). Les cellules ont été incubées 2 jours à 30°C.

B. Résistance au 4NQO des mutants *oca1Δ*, *ycr095cΔ* et *yhl029cΔ* et des différentes combinaisons de double mutants. Des dilutions sériées d'une souche sauvage (WT) et des différents mutants indiqués ont été spottées sur milieu YPD seul ou additionné de CPT (5μg/mL), 4NQO (0,1μg/mL) ou HU (100mM). Les cellules ont été incubées 2 jours à 30°C.

Enfin, pour tous les suppresseurs ayant montré une sensibilité à un stress génotoxique, il est bien entendu possible de tester s'ils font partie de la voie Rad53 en inactivant *RAD53* au sein de chaque mutant et en déterminant si leur sensibilité s'ajoute ou non à celle de *rad53Δ*.

6.3 Qui étudier ?

La combinaison des analyses bio-informatiques et phénotypiques, en plus d'impliquer pour la première fois dans la réponse aux dommages de l'ADN plusieurs nouveaux facteurs (*OCA1/OCA4/OCA5...*) et révéler des phénotypes originaux pour des complexes connus (NMD, protéasome), a restreint la liste des candidats à étudier en priorité. Ces candidats répondent au mieux aux critères suivants : avoir un phénotype en présence de stress génotoxique, faire partie d'un groupe fonctionnel clairement identifié, présenter des interactions physiques ou génétiques avec des membres de la voie de réponse aux dommages à l'ADN ou, à défaut, une bibliographie alléchante, enfin avoir été retrouvés plusieurs fois dans le crible et supprimer fortement la toxicité de *RAD53-DL*. En plus de *PAN2*, 3 gènes figurant parmi ces candidats ont été impliqués dans la réponse aux dommages de l'ADN depuis la réalisation du crible.

IES4, qui code une sous-unité du complexe de remodelage de la chromatine INO80, a très récemment été relié aux checkpoints de l'ADN (Morrison et al, 2007). *Ies4* est phosphorylée de façon Mec1- et Tel1-dépendante suite à un stress réplcatif, et module en réponse l'activité des protéines de checkpoint.

LGE1 code une protéine qui, associée à Bre1p et Rad6, est indispensable à la monoubiquitinylation de l'histone H2B sur la lysine 123 (Hwang et al, 2003), une modification requise pour la méthylation de la lysine 79 de l'histone H3 par la méthyltransférase Dot1 chez *S. cerevisiae* et l'activation de Rad53 en réponse aux stress génotoxiques (Giannattasio et al, 2005). Les liens de plus en plus étroits entre les modifications de la chromatine et la réponse aux dommages de l'ADN suggèrent également que les suppresseurs *IES5* et *SNF11*, qui codent respectivement une sous-unité des complexes INO80 et SWI/SNF de remodelage de la chromatine, fassent eux aussi partie de la DDR (pour une revue, (Downs et al, 2007)).

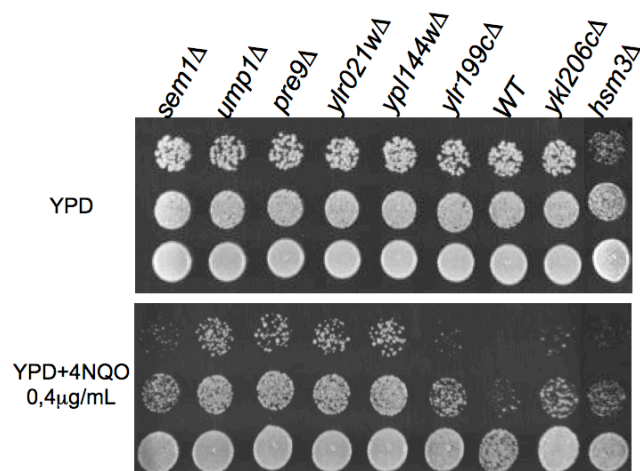


Figure RI 15. Résistance au stress génotoxique des mutants du groupe fonctionnel « protéasome »

Des dilutions sériées d'une souche sauvage (WT) et des différents mutants indiqués ont été spottées sur milieu YPD seul ou additionné de 4NQO (0,4µg/mL). Les cellules ont été incubées 2 jours à 30°C.

HOS2 code une histone déacétylase requise pour l'activation du gène *RNR3* en réponse aux dommages de l'ADN, *via* la déacétylation de lysines spécifiques des histones H3 et H4 (Sharma et al, 2007). Le gène *RNR3* est une cible de Rad53 dont la transcription est suractivée

par *RAD53-DL* (Marsolier et al, 2000). En inactivant *HOS2*, on réduit la suractivation de Rnr3, ce qui pourrait être à l'origine de l'effet suppresseur. Il reste à déterminer si Hos2 agit en aval ou en parallèle de Rad53. *RFM1*, un autre suppresseur codant une sous-unité d'un complexe de déacétylation des histones et pour lequel nous avons observé une sensibilité aux stress génotoxiques, fait également figure de composant potentiel de la DDR.

Sans verser dans l'autosatisfaction, ces résultats confirment à la fois l'intérêt de l'allèle *RAD53-DL* et la sensibilité de notre analyse phénotypique. Surtout, nos travaux ont permis de rapprocher 5 gènes aux fonctions inconnues (*YLR021W*, *YPL144W*, *YLR199C*, *YKL206C* et *HSM3*) de la voie du protéasome. Découvrir leur fonction précise au sein du protéasome a en fait constitué l'objet principal de ma thèse et concentré les efforts du laboratoire. Les études décrites ci-après afin de poursuivre la caractérisation des suppresseurs et identifier *in fine* de nouveaux partenaires de Rad53 n'ont pour l'heure pas été réalisées.

6.4 Perspectives du cribles

6.4.1 Autres analyses des suppresseurs

D'après l'analyse phénotypique réalisée, une majorité des suppresseurs isolés se comportent comme une souche sauvage en présence de 4NQO, CPT ou HU. Serait-ce à dire qu'ils ne font pas partie de la réponse aux dommages de l'ADN ? Heureusement, non. Du moins l'espoir demeure. En effet, l'implication de nombreuses protéines au sein d'un processus donné, du fait de redondances fonctionnelles notamment, ne peut être révélée que dans certains contextes pathologiques, telles que l'absence de certains gènes impliqués dans le même processus cellulaire. On parle alors de défauts synthétiques. Nous avons donc décidé de rechercher si des interactions génétiques existent entre les suppresseurs et différents mutants des checkpoints ou des systèmes de réparation de l'ADN. De la même façon, l'étude systématique des relations d'épistasie en présence de stress génotoxique entre les suppresseurs hyper-sensibles et les mutants de la DDR, en particulier *rad53Δ*, pourrait nous rapprocher de la fonction précise de ces facteurs dans la réponse aux dommages de l'ADN.

6.4.2 Et Rad53 ?

Définir les interactions entre les facteurs identifiés par le crible et Rad53 constitue l'essence même de notre étude. En plus des tests génétiques décrits ci-dessus, plusieurs analyses à l'échelle de l'ensemble des suppresseurs, ou tout au moins pour les meilleurs candidats, sont envisageables.

Les 110 suppresseurs identifiés sont autant d'activateurs ou de cibles potentiels de Rad53. Un premier test sur leur capacité à moduler l'activation de Rad53 en réponse à différents stress génotoxiques, visualisée en Western blot, permettrait déjà de déterminer s'ils sont susceptibles d'agir en amont ou en aval de Rad53 (**figure RI 16**).

De plus, nous pourrions détecter d'éventuelles interactions physiques avec Rad53 grâce à la méthodologie double-hybride, ou bien par des méthodes de co-immunoprécipitation. Nous disposons en effet au laboratoire d'une collection dont les souches expriment chacune une protéine particulière fusionnée en C-terminal avec l'étiquette TAP (Tandem Affinity Purification). L'étiquette TAP permet une purification rapide et efficace de la protéine d'intérêt et, associée à une méthode de détection appropriée, l'identification des protéines associées (Rigaut et al, 1999). Grâce à l'étiquette TAP, nous pourrions aussi visualiser en Western blot si la migration électrophorétique des protéines est retardée suite à un stress

généotoxique – et si un tel retard est détecté, tester s'il correspond à une phosphorylation par des traitements à la phosphatase, puis déterminer si cette phosphorylation est abolie dans des mutants *rad53Δ*. Enfin, une méthode chimio-génétique développée par le Dr Shokat permet, en modifiant l'encombrement stérique au niveau de la poche de liaison à l'ATP grâce à des mutations ponctuelles remplaçant un résidu volumineux par un résidu plus petit, de créer des protéines kinases spécifiquement sensibles à certains analogues de l'ATP (Bishop et al, 2000). De telles formes de la protéine kinase Rad53 ont été développées au laboratoire par le Dr A. Peyroche, qui rendraient alors possible de déterminer si les cibles supposées de Rad53 sont ses substrats directs ou non.

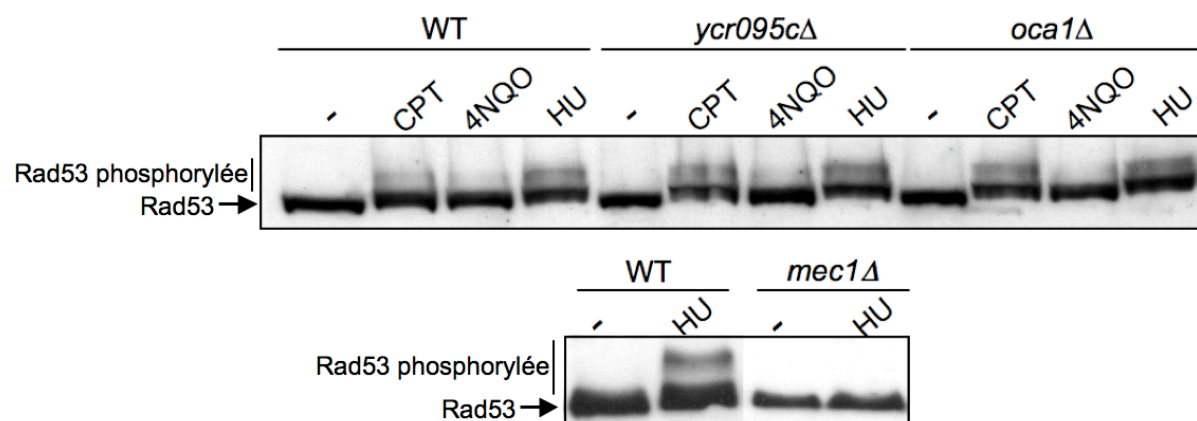


Figure RI 16. Influence de différents suppresseurs sur l'activation de Rad53 en réponse au stress génotoxique

Des extraits protéiques totaux réalisés à partir de souches sauvage (WT), *ycr095cΔ* ou *oca1Δ* cultivées en absence (-) ou en présence de CPT (15µg/mL), de 4NQO (2µg/mL) ou de HU (200mM) ont été analysés par Western blot avec des anticorps anti-Rad53. Les formes phosphorylées de Rad53 entraînent un retard de migration visualisé sous forme de smire. La souche *mec1Δ* (transformée avec un plasmide de surexpression de *RNR1*) sert de contrôle positif : la phosphorylation de Rad53 en réponse à l'hydroxurée est abolie en absence de Mec1.

ORF	Protéine	Fonction	Occurrence
YDR217C	Rad9	Protéine des checkpoints de l'ADN	2
YLR113W	Hog1	MAPK ; voie de réponse au stress osmotique	7
YJL128C	Pbs2	MAPKK ; voie de réponse au stress osmotique	22
YLR006C	Ssk1	Kinase ; voie de réponse au stress osmotique	1
YMR174C	Pai3	Inhibiteur de la protéinase A cytoplasmique ; expression induite par le stress osmotique de façon Pbs2 et Hog1-dépendante	1
YMR080C	Nam7/Upf1	Hélicase ARN ; impliquée dans le NMD (nonsense mediated mRNA-decay)	1
YHR077C	Nmd2/Upf2	Composant du NMD (nonsense mediated mRNA-decay)	1
YGR072W	Upf3	Composant du NMD (nonsense mediated mRNA-decay)	1
YGL094C	Pan2	Sous-unité du complexe poly(A)-ribonucléase	7
YGR178C	Pbp1	Facteur de contrôle de la polyadénylation	1
YDR395W	Sxm1	Transporteur nucléaire de Pab1	4
YNL099C	Oca1	Tyrosine phosphatase putative, arrêt G1 en réponse au stress oxydant	4
YHL029C	?	?	2
YCR095C	?	Tyrosine phosphatase putative	1
YDR363W-A	Sem1	Sous-unité du couvercle du protéasome	6
YGR135W	Pre9	Sous-unité α 3 du protéasome 20S	1
YBR173C	Ump1	Chaperon du protéasome 20S	1
YLR021W	?	?	1
YPL144W	?	?	1
YLR199C	?	?	1
YKL206C	?	?	2
YBR272C	Hsm3	?	1
YJL142C	Irc9	Mutant présentant une augmentation de foyers spontanés Rad52	1
YPL055C	Lge1	Monoubiquitinylation de l'histone H2B	1
YDR073W	Snf1	Sous-unité du complexe SWI/SNF de remodelage de la chromatine	1
YOR189W	Ies4	Sous-unité du complexe INO80 de remodelage de la chromatine	1
YER092W	Ies5	Sous-unité du complexe INO80 de remodelage de la chromatine	2
YOR191W	Ris1	ATPase ; membre de la famille SWI/SNF	2
YOR279C	Rfm1	Sous-unité du complexe Sum1-Rfm1-Hst1 de déacétylation des histones	1
YGL194C	Hos2	Histone déacétylase ; impliquée dans l'activation de certains gènes	1
YMR037C	Msn2	Activateur transcriptionnel	2
YMR039C	Sub1	Co-activateur transcriptionnel	2
YOR298C-A	Mbf1	Co-activateur transcriptionnel	1
YIR018W	Yap5	Facteur transcriptionnel	1
YPL139C	Ume1	Répresseur de la transcription des gènes méiotiques	6
YJL098W	Sap185	Protéine formant un complexe avec la phosphatase Sit4 impliquée dans la transition G1/S	1
YLR224W	?	Protéine à F-box ; composant des complexes ubiquitine-ligase SCF	1
YJR075W	Hoc1	Alpha-1,6-mannosyltransférase ; impliquée dans la biosynthèse de la paroi cellulaire	1
YIL011W	Tir3	Protéine de la paroi cellulaire	3
YGR189C	Crh1	Glycosidase putative de la paroi cellulaire	1
YIR021W	Mrs1	Protéine impliquée dans l'épissage des introns des ARN mitochondriaux	1
YJL133W	Mrs3	Transporteur mitochondrial du fer	1
YMR287C	Msu1	RNase, composant du dégradosome mitochondrial	1
YIL043C	Cbr1	Cytochrome b réductase	1
YML009C	Mrp139	Protéine ribosomique mitochondriale	1
YMR056C	Aac1	Translocateur ADP/ATP de la membrane mitochondriale interne	1
YIL125W	Kgd1	Composant du complexe mitochondrial α -kétoglutarate déhydrogénase	1
YPR151C	Sue1	Protéine mitochondriale ; impliquée dans la dégradation du cytochrome c	1
YMR214W	Scj1	Homologue du chaperon bactérien DnaJ	1
YMR186W	Hsc82	Chaperon cytoplasmique de la famille Hsp90	1
YOL113W	Skm1	Sérine/thréonine kinase ; impliquée dans la croissance polarisée	1
YMR016C	Sok2	Régulateur de la signalisation AMPc-PKA (cAMP-dependent Protein kinase)	2
YOR371C	Gpb1	Régulateur de la signalisation AMPc-PKA	1
YOR360C	Pde2	AMPc phosphodiesterase	3
YOR180C	Dci1	Delta(3,5)-delta(2,4)-dienoyl-CoA isomérase péroxisomale ; impliquée dans le métabolisme des acides gras	1
YIL160C	Pot1	3-kétoacyl-CoA thiolase ; impliquée dans le métabolisme des acides gras	3
YDR297W	Sur2	Sphinganine C4-hydroxylase ; impliquée dans la biosynthèse des sphingolipides	1
YHL003C	Lag1	Composant de la céramide synthase	1
YDR459C	Pfa5	Palmitoyltransférase	1
YML022W	Apt1	Adénine phosphoribosyltransférase	1
YDR305C	Hnt2	Dinucleoside triphosphate hydrolase	1
YER175C	Tmt1	Trans-aconitate méthyltransférase	1
YIL124W	Ayr1	1-acyl dihydroxyacétone phosphate réductase ; impliquée dans la biogenèse des acides phosphatidiques	4
YJR153W	Pgu1	Endo-polygalacturonase	1
YCL050C	Apa1	Diadénosine 5',5"-P1,P4-tétraphosphate phosphorylase I	1
YIL107C	Pfk26	6-phosphofructo-2-kinase	1
YBR271W	?	S-adenosylméthionine-dépendante méthyltransférase putative	1
YOR243C	Pus7	Pseudouridine synthase	1
YKR069W	Met1	S-adenosyl-L-méthionine uroporphyrinogen III transméthylase	1
YNR057C	Bio4	Déthiobiotine synthétase ; impliquée dans la biosynthèse de la biotine	3
YKL191W	Dph2	Protéine impliquée dans la synthèse de diphtamide	2
YOL062C	Apm4	Sous-unité du complexe protéique associé à la clathrine (AP-2) ; impliquée dans le transport vésiculaire	1
YGR142W	Btn2	Protéine cytosolique ; potentiellement impliquée dans le trafic intracellulaire	1
YHR135C	Yck1	Isoforme de la caséine kinase I ; impliquée dans le trafic intracellulaire	1
YCL011C	Gbp2	Protéine de liaison aux ARN poly(A+) ; impliquée dans l'export nucléaire des ARNm	1
YIL079C	Air1	Protéine à domaine RING ; impliquée dans la maturation et l'export des ARNm	1
YDR144C	Mkc7	Aspartyl protéase ; impliquée dans le clivage des protéines	1
YBR286W	Ape3	Aminopeptidase Y vacuolaire	1
YIL034C	Cap2	Sous-unité β du complexe CP (Capping protein) régulant la polymérisation des filaments d'actine	3
YGR288W	Mal13	Protéine activatrice du locus MAL	1
YIL023C	Yke4	Transporteur de zinc du reticulum endoplasmique	1
YDR135C	Ycf1	Transporteur vacuolaire de la famille ABC (ATP-binding cassette) ; impliqué dans la détoxification des métaux	1
YPL058C	Pdr12	Transporteur ABC de la membrane plasmique ; impliqué dans la résistance aux acides organiques	1
YOL109W	Zeo1	Protéine de la membrane plasmique ; impliquée dans la régulation de l'intégrité cellulaire	1
YLR018C	Pom34	Protéine du pore nucléaire	1
YOL091W	Spo21	Composant de la plaque méiotique externe du corps polaire du fuseau	1
YMR065C	Kar5	Protéine impliquée dans la fusion des membranes nucléaires au cours de la karyogamie	1

Tableau RI 1. Gènes dont l'inactivation supprime la toxicité de RAD53-DL. Les 110 suppresseurs ont été répartis en groupe fonctionnels (en couleur) ou selon leur fonction cellulaire (en blanc).

ORF	Protéine	Fonction	Occurrence
YGL258W	Vel1	?	1
YAR042W	Swh1	?	1
YHR059W	Fyv4	?	2
YCL036W	Gfd2	?	2
YOR052C	?	?	5
YIL057C	?	?	2
YIL032C	?	?	2
YCL056C	?	?	2
YOR277C	?	?	1
YNL198C	?	?	1
YMR135W-A	?	?	1
YKL105C	?	?	1
YIL055C	?	?	1
YMR262W	?	?	1
YGR219W	?	?	1
YJL218W	?	?	1
YLR456W	?	?	1
YER137W-A	?	?	1
YDL057W	?	?	1
YKR047W	?	?	1
YOR051C	?	?	1
YPR097W	?	?	1
YJR107W	?	?	1

Tableau RI 1 (suite). Gènes dont l'inactivation supprime la toxicité de *RAD53-DL*. Les 110 supresseurs ont été répartis en groupe fonctionnels (en couleur) ou selon leur fonction cellulaire (en blanc).

2^{ème} partie : Identification et caractérisation de nouveaux facteurs d'assemblage du protéasome chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*

1. Introduction

8 supresseurs de la toxicité de *RAD53-DL* confèrent aux cellules une hyper-résistance aux agents génotoxiques 4NQO, MMS et camptothécine. Parmi eux, 3 gènes codent des sous-unités (*SEMI*, *PRE9*) ou une protéine chaperonne (*UMPI*) du protéasome ; les 5 autres (*YLR021W*, *YPL144W*, *YLR199C*, *YKL206C* et *HSM3*) correspondent à des ORF peu ou pas caractérisées. Des tests d'épistasie combinant chacun des 5 mutants « inconnus » avec chacun des 3 mutants du protéasome n'ont jamais révélé la moindre additivité pour la résistance au 4NQO ni pour la suppression de *RAD53-DL*. Ces 8 supresseurs forment donc un groupe d'épistasie pour la réponse au 4NQO et la suppression de *RAD53-DL*. En d'autres termes, les gènes *YLR021W*, *YPL144W*, *YLR199C*, *YKL206C* et *HSM3* font partie de la voie du protéasome. Voici leur histoire.

2. L'assemblage du protéasome 20S est orchestré par 2 paires de protéines chaperonnes chez la levure et chez les mammifères

2.1 Article, figures et discussion supplémentaires

20S Proteasome Assembly Is Orchestrated by Two Distinct Pairs of Chaperones in Yeast and in Mammals

Benoît Le Tallec,¹ Marie-Bénédicte Barrault,¹ Régis Courbeyrette,¹ Raphaël Guérois,² Marie-Claude Marsolier-Kergoat,¹ and Anne Peyroche^{1,*}

¹CEA, iBiTecS, SBIGeM, Laboratoire du Métabolisme de l'ADN et Réponses aux Génotoxiques, Gif-sur-Yvette, F-91191, France

²CEA, iBiTecS, SB²SM, Laboratoire de Biologie Structurale et Radiobiologie, Gif-sur-Yvette, F-91191, France

*Correspondence: anne.peyroche@cea.fr

DOI 10.1016/j.molcel.2007.06.025

SUMMARY

The 20S proteasome is the catalytic core of the 26S proteasome, a central enzyme in the ubiquitin-proteasome system. Its assembly proceeds in a multistep and orderly fashion. Ump1 is the only well-described chaperone dedicated to the assembly of the 20S proteasome in yeast. Here, we report a phenotype related to the DNA damage response that allowed us to isolate four other chaperones of yeast 20S proteasomes, which we named Poc1–Poc4. Poc1/2 and Poc3/4 form two pairs working at different stages in early 20S proteasome assembly. We identify PAC1, PAC2, the recently described PAC3, and an uncharacterized protein that we named PAC4 as functional mammalian homologs of yeast Poc factors. Hence, in yeast as in mammals, proteasome assembly is orchestrated by two pairs of chaperones acting upstream of the half-proteasome maturase Ump1. Our findings provide evidence for a remarkable conservation of a pairwise chaperone-assisted proteasome assembly throughout evolution.

INTRODUCTION

DNA damage activates checkpoint signaling pathways that delay the cell cycle and activate DNA repair processes (Zhou and Elledge, 2000). DNA damage checkpoint pathways are well conserved from yeast to human cells (Melo and Toczyski, 2002). In budding yeast, the essential protein kinase Rad53 is a central element in the DNA damage response. Rad53 is activated in response to genotoxic insults or replication blocks and is required to prevent cell-cycle progression, stabilize replication forks, and facilitate repair. Thus, Rad53 and its mammalian homolog Chk2 orchestrate various cellular pathways in response to DNA damage.

The ubiquitin-proteasome system (UPS) is the major proteolytic system in the cytosol and nucleus of all eukaryotic cells. Short-lived proteins as well as abnormal proteins are marked with ubiquitin chains. Polyubiquitinated proteins are subsequently recognized and degraded by the proteasome. The UPS plays crucial roles in a large variety of essential cellular functions as diverse as cell-cycle control, DNA repair, transcription, signal transduction, and antigen presentation (Glickman and Ciechanover, 2002; Wolf and Hilt, 2004).

The 26S proteasome, the central enzyme of this pathway, comprises the catalytic core particle (CP or 20S particle) sandwiched by two regulatory particles (RP or 19S caps) (Baumeister et al., 1998). The 20S proteasome occurs in all three kingdoms of life and is ubiquitous in archae and eukaryotes, having a conserved overall architecture (Groll et al., 2005). CP proteasome has a barrel-shaped structure consisting of four stacked heptameric rings. In eukaryotes, each outer ring is composed of seven different α -type subunits, while each inner ring is composed of seven different β -type subunits (Baumeister et al., 1998). Proteolytic activity, located in the central cavity of the proteasome barrel, is carried by only three of the seven β subunits, namely β 1, β 2, and β 5 (yeast Pre3, Pup1, and Pre2, respectively). These subunits provide the N-terminal threonine residues, which act as nucleophiles for the three distinct catalytic activities, namely the “caspase-like” (cleavage after acidic residues) activity for β 1/Pre3, the “trypsin-like” (cleavage after basic residues) activity for β 2/Pup1, and the “chymotrypsin-like” (cleavage after hydrophobic residues) activity for β 5/Pre2 (Arendt and Hochstrasser, 1997; Chen and Hochstrasser, 1996; Heinemeyer et al., 1997). These three β subunits are synthesized as inactive precursors containing an N-terminal propeptide, which is cleaved off autocatalytically at the end of proteasome assembly to give active mature β subunits (Chen and Hochstrasser, 1996; Schmidtke et al., 1996; Seemuller et al., 1996).

Proteasome biogenesis is a highly orchestrated multistep event involving the biosynthesis of all subunits, their assembly, and their maturation processes. α -ring formation is considered the initial step. The seven β subunits are then arranged on the α -ring to form a half-proteasome

intermediate (15S), which contains unprocessed b subunit precursors. An early 13S precursor intermediate composed of all seven a subunits and b2, b3, and b4 subunits has been identified both in mammals and yeast (Li et al., 2007; Nandi et al., 1997; Schmidtke et al., 1997). Next, the dimerization of two half-proteasomes is coupled with the detachment of b-propeptides (Chen and Hochstrasser, 1996; Frentzel et al., 1994; Nandi et al., 1997; Schmidtke et al., 1997). Thus, activation of proteolytic sites is prevented until the central hydrolytic chamber is confined through correct association of two half-proteasomes (Chen and Hochstrasser, 1996). These different steps do not necessarily take place within the same intracellular compartment. Yeast 20S proteasomes are imported as precursor complexes into the nucleus, where their final maturation is thought to occur (Lehmann et al., 2002).

Proper subunit-subunit contacts are required for optimal proteasome assembly. In yeast cells lacking a3/Pre9, the only nonessential subunit of the 20S proteasome, a3/Pre9 is substituted in a-rings by the neighboring a4/Pre6 subunit, but this delays the biogenesis of proteasomes (Velichutina et al., 2004). b-trans-b (between two b-rings) contact regions are also important for proteasome assembly (Li et al., 2007; Ramos et al., 2004; Witt et al., 2006). Moreover, prosequences of b subunits are required for efficient assembly in eukaryotes and can be considered as intramolecular chaperones. In yeast, the essential b5/Pre2 propeptide, when isolated, can even operate in trans, acting as a chaperone-like peptide (Chen and Hochstrasser, 1996).

Proteasome maturation in eukaryotes also requires additional proteasome-dedicated accessory proteins that assist assembling steps. The only well-described 20S proteasome chaperone in yeast is the short-lived protein Ump1. Ump1 is associated with half-proteasomes and coordinates the processing of b subunits with the dimerization of the two half proteasomes. Ump1, buried inside nascent proteasomes, is degraded as the first substrate of the newly assembled proteasome (Ramos et al., 1998). Mouse and human homologs of Ump1 (m/hUmp1 or POMP or proteasemblin) with low sequence similarity have been identified (Burri et al., 2000; Griffin et al., 2000; Witt et al., 2000). Although functionally related, yeast and mammalian Ump1 are not interchangeable (Burri et al., 2000).

As spontaneous assembly of the homoheptameric a-ring of the archaean 20S proteasome can occur (Zwickl et al., 1994), the assembly of eukaryotic 20S proteasomes has been presumed for a long time to start by spontaneous formation of a-rings. However, recent studies have revealed that early steps of the 20S proteasome assembly are assisted by several chaperones in mammalian cells. A heterodimeric complex of proteasome assembling chaperones 1 and 2 (PAC1-PAC2) promotes the a-ring assembly but also prevents the dimerization of a-rings (Hirano et al., 2005). These chaperones are degraded in a proteasome-dependent manner upon completion of 20S

maturation. Assembly intermediates containing a complex homologous to PAC1/2 have been very recently described in yeast (Li et al., 2007).

A third human 20S proteasome chaperone named PAC3 has been identified as a component of the a-ring-PAC1-PAC2 complex (Hirano et al., 2006). PAC3 can bind directly to both a and b subunits but dissociates before the formation of half-proteasomes, probably upon recruitment of hUmp1. PAC3 is proposed to cooperate with PAC1-PAC2 heterodimers to orchestrate the correct assembly of mammalian CP proteasomes. Until now, existence of a functional homolog of PAC3 in *Saccharomyces cerevisiae* has remained elusive. It has been suggested that the chaperone dependency becomes higher in mammals (Murata, 2006). Moreover, the precise mechanism by which b subunits and Ump1 are assembled on a-rings is still unclear. To clarify these points, identification of other proteins assisting proteasome maturation, in yeast as in mammals, remains of importance.

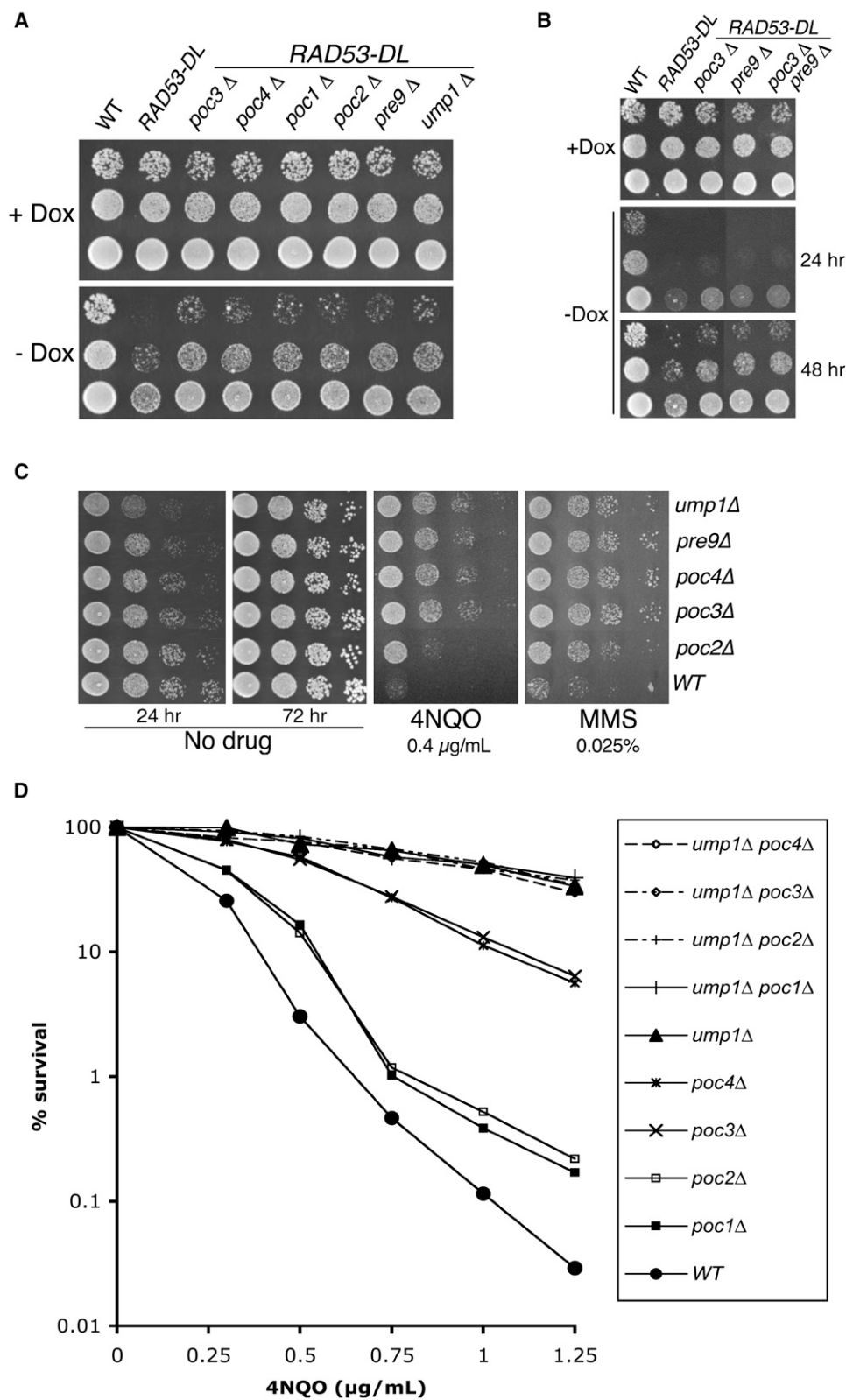
In this study, we describe a striking phenotype related to the DNA damage response that allowed us to isolate four proteasome-specialized chaperones in budding yeast. We have named these chaperones Poc1, Poc2, Poc3, and Poc4. Biochemical and genetic data indicate that the four Poc factors form two pairs, which operate at different stages of 20S proteasome assembly upstream of the half-proteasome maturase Ump1. Moreover, we identify PAC1, PAC2, the recently described PAC3, and an uncharacterized protein that we named PAC4 as functional mammalian homologs of yeast Poc factors. Our results point out a remarkable conservation throughout evolution of a pairwise orchestration of the 20S proteasome assembly.

RESULTS

POC1, POC2, POC3, POC4, PRE9, and UMP1 Belong to an Epistatic Group Regarding the DNA Damage Response

RAD53-DL is a conditional dominant lethal allele of RAD53 that encodes a hyperactive form of Rad53 and triggers, in the absence of genotoxic stress, physiological events normally induced by DNA damage or replication blocks (Marsolier et al., 2000). Hence, expression of RAD53-DL leads to growth impairment. To uncover new regulatory elements of Rad53 pathways, we carried out a genome-wide screen to identify genes whose deletion suppresses RAD53-DL toxicity (detailed in the Supplemental Data available with this article online). We isolated PRE9, UMP1, and four genes: YLR199c (alias PBA1), YKL206c (alias ADD66/PBA2), YLR021w (alias IRC25), and YPL144w (Figure 1A). We renamed the last four genes as POC for proteasome chaperone (see below): POC1 for YLR199c, POC2 for YKL206c, POC3 for YLR021w, and POC4 for YPL144w.

Different combinations of deletions were introduced into the RAD53-DL strain and tested for their ability to alleviate RAD53-DL toxicity. None of the double mutant



strains grew better than the corresponding single mutants, indicating that these genes form an epistatic group with respect to RAD53-DL suppression (Figure 1B and data not shown).

We studied the effect of these deletions in strains harboring only a wild-type RAD53 allele (Figure 1C). *ump1D* cells exhibited a strong growth defect, as previously described (Ramos et al., 1998). *poc3D* and *poc4D* strains grew more slowly than the congenic wild-type strain regardless of the genetic background we tested. No growth defect was observed for *poc1D* or *poc2D* cells. We next explored phenotypes related to the DNA damage response using the carcinogenic bulky alkylating agent 4-nitroquinoline 1-oxide (4NQO), the topoisomerase I inhibitor camptothecin (Cpt), and the alkylating agent methyl methane sulphonate (MMS). Strikingly, mutant strains grew better than the wild-type in the presence of 4NQO, Cpt, and MMS (Figures 1C and 1D and data not shown). The strongest hyperresistance was observed in *ump1D*, then in *pre9D*, *poc3D*, and *poc4D* cells (Figures 1C and 1D). A mild but reproducible resistance was observed for *poc1D* and *poc2D* strains. To establish whether POC genes, UMP1, and PRE9 affect genotoxic resistance via common or separate mechanisms, we quantified the survival of single and double deletion strains in the presence of 4NQO (Figure 1D). There was no additive resistance to 4NQO when each single *poc* mutant was combined with *ump1D*, indicating that the POC genes belong to the UMP1 epistatic group for this phenotype. We obtained similar results for *poc* mutants with PRE9 (data not shown).

Altogether, our results indicate that POC1, POC2, POC3, POC4, UMP1, and PRE9 gene products participate in a common pathway in DNA damage response. Since Ump1 and Pre9 proteins are involved in maturation and/or structure of the 26S proteasome (Ramos et al., 1998; Velichutina et al., 2004), we investigated the role of Poc factors in proteasome functions.

POC1, POC2, POC3, and POC4 Are Genetically Linked to Proteasome Functions

If proper proteasome function requires Poc factors, *poc* mutants should exacerbate the growth defect of some proteasome mutants. RPN4 encodes a transcriptional regulator of proteasome genes, whose deletion leads to lethality in some proteasome mutants (Xie and Varshavsky, 2001). POC3 or POC4 deletion, like PRE9 deletion, caused lethality when combined with a deletion of RPN4 (Figure 2A). Even though *poc1D rpn4D* and *poc2D rpn4D* cells were viable, their growth was strongly im-

paired, especially at 37 C (Figure 2B). RPN10 codes for a nonessential RP proteasome subunit, whose deletion impairs growth of some proteasome mutants (Pan et al., 2006). We observed that *pre9D rpn10D*, *poc3D rpn10D*, and *poc4D rpn10D* cells could barely form colonies at 37 C and exhibited slower vegetative growth compared to single deletion mutants at other temperatures (Figures 2C and 2D). No synthetic effect was detected for *poc1D rpn10D* and *poc2D rpn10D* strains (data not shown).

ump1D and many proteasome subunit mutants are hypersensitive to canavanine, an arginine analog that impairs protein synthesis (Ramos et al., 1998). We found that *poc3D* and *poc4D* cells were hypersensitive to canavanine, but not *poc1D* and *poc2D* mutants (Figure S1).

The Poc Factors Are Components of CP Proteasome Precursors

We next assayed for a physical interaction between the Poc factors and the proteasomes by using epitope-tagged proteins. All of the epitope-tagged Poc strains we used, except Poc1, have a wild-type phenotype in the presence of 4NQO (Figure S2). We found that Poc factors and myc-tagged α 3/Pre9 efficiently coimmunoprecipitated (Figure 3A, Figure S3). Moreover, several subunits coimmunoprecipitated with the Poc factors (Figure 3B and data not shown), suggesting that Poc factors interact with subunits arranged in complex structures. We next examined coimmunoprecipitation of Poc factors with b subunits. A different migration in SDS-PAGE allows the identification of precursor and mature forms of epitope-tagged b2/Pup1. As expected, Ump1 exclusively coimmunoprecipitated with the unprocessed form of b2/Pup1, whereas α 3/Pre9 was associated with both unprocessed and processed forms of b2/Pup1 (Figure 3C). We found that Poc1 and Poc2 mainly coimmunoprecipitated with unprocessed b2/Pup1 but also, to a lesser extent, with its mature form (Figure 3C, lower panel, and data not shown). By contrast, Poc3 and Poc4 selectively coimmunoprecipitated with the precursor form of b2/Pup1 (Figure 3C). Coimmunoprecipitation between RP subunits and Poc3 or Poc4 was inefficient (Figure S3). Thus, these results indicate a preferential association of Poc proteins with CP components, which does not require the RP.

Gel filtration chromatography allows the resolution of 26S and 20S proteasomes from precursor subparticles such as the half-proteasomes (15S intermediates) containing Ump1 (Ramos et al., 1998). We analyzed the distribution of Poc factors in relation to proteasome subunits from strains expressing epitope-tagged versions of the

Figure 1. UMP1, PRE9, POC1, POC2, POC3, and POC4 Belong to a Common Group Regarding the DNA Damage Response

(A and B) Ten-fold serial dilutions of the indicated mutants in the RAD53-DL background were spotted onto YPD plates under permissive conditions (with doxycycline [+ Dox]) or restrictive conditions (without doxycycline [- Dox]). The wild-type strain (WT) was spotted as a reference. Plates were incubated at 30 C for 2 days unless indicated otherwise.

(C) Ten-fold serial dilutions of the indicated mutants were spotted onto YPD plates (no drug), YPD containing either 4NQO (0.4 mg/mL) or MMS (0.025% [v/v]), and incubated for 3 days at 30 C unless indicated otherwise.

(D) Early exponential phase cells were plated onto YPD plates with the indicated concentrations of 4NQO. After incubation for 3 days at 30 C, viable colonies were counted. Relevant genotypes of the different congenic strains are indicated on the right.

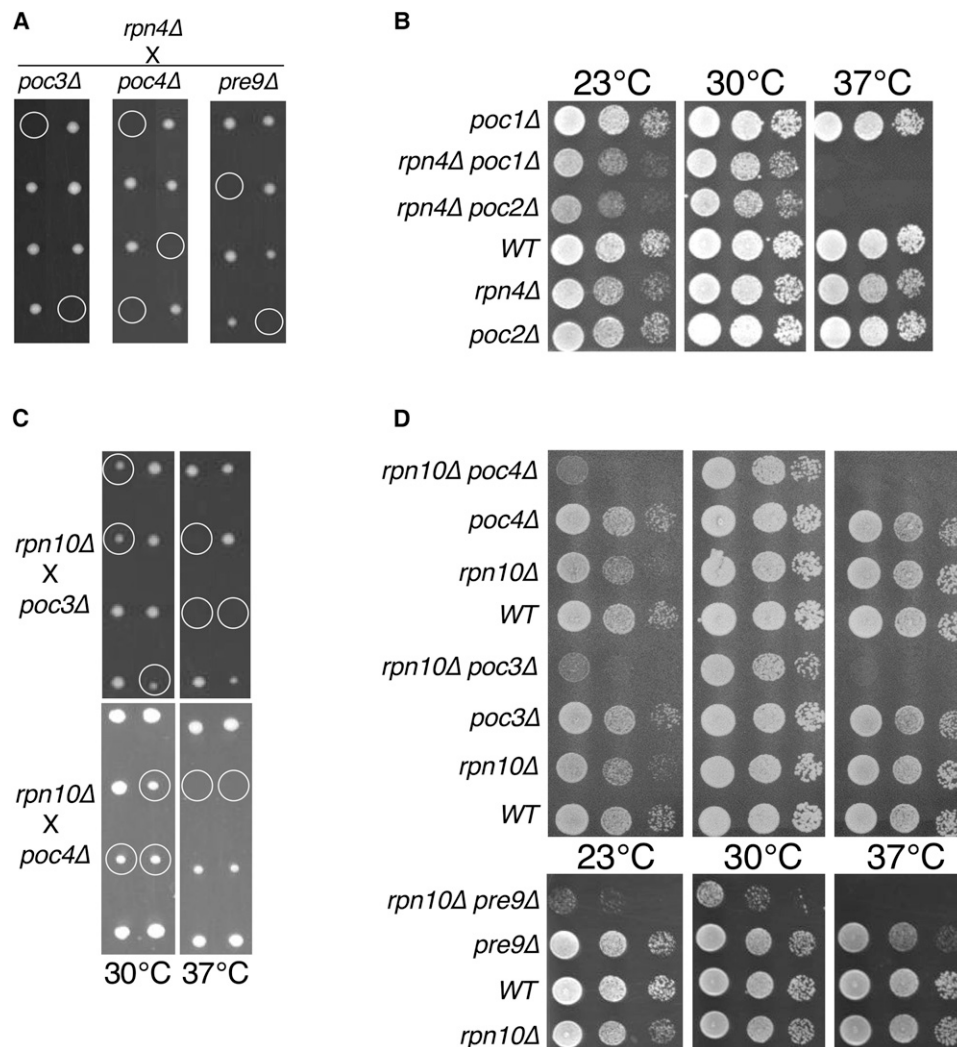


Figure 2. POC Genes Are Genetically Linked to Proteasome Functions

(A and C) Heterozygous double mutants were sporulated. The resulting tetrads were dissected and incubated at 30°C (A) or at the indicated temperatures (C) onto YPD plates. Circled are the colonies germinated from double mutant spores. (B and D) Ten-fold serial dilutions of the indicated strains were spotted onto YPD plates and incubated at the indicated temperatures for 2 days.

different proteins (Figure 3D). Mature forms of 20S were mainly collected before fraction 8, whereas 15S precursor forms containing unprocessed b5/Pre2 coeluted with Ump1 in fractions 9–13. Like Ump1, Poc3 and Poc4 were mainly collected in fractions 9–13. The profile of Poc1 and Poc2 proteins was close to that of Poc3/4, but, in addition to 15S-containing fractions, they were associated with fractions containing processed b subunits, which is consistent with immunoprecipitation experiments.

Altogether, our biochemical results indicate that Poc3 and Poc4 are part of precursor forms of 20S proteasome containing both a subunits and at least some unprocessed b subunits, whereas Poc1 and Poc2 are associated with precursor and mature forms of CP proteasome.

Poc1/2 and Poc3/4 Act as Two Distinct Chaperone Pairs In Vivo

Regarding biochemical and genetic data (Figures 2, 3C, and 3D), there was a strikingly similar behavior for Poc1 and Poc2 on the one hand and Poc3 and Poc4 on the other hand. Moreover, hyperresistance to 4NQO of poc3Δ and poc4Δ cells was identical (Figures 1D and 4A), and double mutants displayed the same resistance than parental strains (Figure 4A, right panel). The hyperresistance of poc1Δ or poc2Δ cells was more modest but once again identical for single and double mutants (Figures 1D and 4A, left panel). These observations led us to hypothesize that the Poc proteins could act as two distinct pairs, one formed by Poc1 and Poc2 and the other by Poc3 and Poc4. Consistently, we observed a strong interaction between Poc3 and Poc4 in coimmunoprecipitation

experiments (Figure 4B). In the same way, Poc1 and Poc2 coimmunoprecipitated very efficiently (Figure 4B). Additional biochemical evidence that Poc1 and Poc2 form a pair associated with the proteasome was published while this manuscript was under review (Li et al., 2007). In contrast, coimmunoprecipitation between Poc2 and Poc3 was less efficient (Figure S3) despite an overlapping distribution in gel filtration, which suggests that this complex is either less abundant or less stable than the Poc1/Poc2- and Poc3/Poc4-containing complexes. Altogether, these results suggest that Poc1/2 and Poc3/4 are distinct entities mainly functioning as two separate pairs in vivo.

Poc3 and Poc4 Form a Heterodimeric Complex

To confirm that Poc3 and Poc4 could act as a pair, we investigated a direct interaction using bacterially expressed proteins. Whereas each protein individually expressed was quite insoluble, coexpression resulted in a dramatic increase in the level of soluble proteins (Figure 4C left panel and data not shown). Such an increase in solubility is strongly indicative of a stable association between the two proteins. Indeed, recombinant Poc3-Stag protein copurified with 6xHis-Poc4 on nickel resin (Figure 4C, right panel), and reciprocally, recombinant Poc4-Stag protein coeluted with 6xHis-Poc3 protein immobilized on nickel beads (data not shown). Analysis of purified Poc3-Poc4 by gel filtration indicated that they were part of a 40 kDa complex corresponding to a heterodimeric complex (Figure 4D). We detected higher multihetero-oligomers, some of which could correspond to tetramers. We observed that homodimers of each His-tagged protein could also be formed (data not shown).

Thus, biochemical data strengthen the conclusions raised from genetic analyses and strongly suggest that Poc3 and Poc4 act together.

Poc3 and Poc4 Are Required for Correct Proteasome Maturation

We next asked whether the absence of Poc factors had any functional impact on the maturation and activity of the proteasome. Most mutants affected either in the proteasome biogenesis or function are defective in the degradation of high-molecular-weight ubiquitin (Ub) conjugates (London et al., 2004). poc3D and poc4D strains accumulated large amounts of poly-Ub proteins, indicating that Poc3 and Poc4 are important for efficient ubiquitin-proteasome-dependent proteolysis (Figure 5A). No significant accumulation of poly-Ub proteins was detected in poc1D and poc2D cells.

The interaction between Poc3/4 and precursors of the 20S proteasomes hinted at a role for Poc3/4 in the 20S proteasome maturation. If proteasome assembly was impaired in the absence of Poc3/4, we should observe an accumulation of precursor forms of proteasome. poc3D and poc4D cells accumulated unprocessed forms of b1, b2, and b5 subunits (Figure 5B and data not shown), as previously observed in ump1D and pre9D cells (Ramos et al., 1998; Velichutina et al., 2004). No such accumulation

was detected in poc1D and poc2D strains (data not shown). To get insight into proteasome maturation defects in the absence of Poc3 or Poc4, size-fractionated extracts from wild-type or mutant cells expressing Myc-tagged b5/Pre2 subunit were analyzed by immunoblotting (Figure 5C). In wild-type cells, most b5/Pre2 was recovered in early fractions (before fraction 8) under its mature form. By contrast, in poc3D and poc4D cells, the majority of b5/Pre2 proteins was found as unprocessed species in fractions 10–14 corresponding to fractions containing Poc3/4 proteins in wild-type cells. In addition, we observed a different processed variant possibly representing a processing intermediate of b5/Pre2. Moreover, pro-Pre2 was also detected in fractions 1–6 that contain mature proteasomes (Figure 5C). This is reminiscent of what was observed in ump1D cells (Ramos et al., 1998). We next tested the proteolytic activities of the size-fractionated extracts using specific fluorogenic substrates. Remarkably, a significant reduction of chymotrypsin-like and caspase-like activities in fractions 1–7 containing the 20S and 26S proteasomes was observed in extracts from poc3D and poc4D cells compared to the wild-type (Figure 5D and data not shown). An increased expression of proteasome subunits in poc3D and poc4D cells (Figure 5B) might partially compensate the reduction of the specific activity similarly to what was described for ump1D (Ramos et al., 1998). We also noted that mature proteasome species and the peak activity in the mutants were shifted toward higher molecular species (Figures 5C and 5D), suggesting that additional polypeptides might be associated with 26S components.

Hence, the defects observed in poc3D and poc4D demonstrate that the Poc3/4 proteins are required for efficient 20S proteasome assembly in yeast.

Steady-State Localization of the Stable Poc3 and Poc4 Proteins Depends on Ump1

Poc factors and Ump1 coeluted in gel filtration and interacted with precursor forms of proteasome. Therefore, we investigated the interaction between Poc factors and Ump1. Ump1 coimmunoprecipitated far more efficiently with Poc1 and Poc2 than with Poc3 and Poc4 (Figure S3). Ump1 and Poc3/4 coimmunoprecipitation was in fact surprisingly faint. To refine the relationships between Ump1 and Poc3/4 proteins, we tested their association with the proteasome in the absence of each other. Neither the association of epitope-tagged Poc3 or Poc4 with the proteasome in immunoprecipitation experiments nor their distribution in gel filtration analysis was notably perturbed in ump1D cells (Figure 6A, upper panel, and data not shown). Reciprocally, Ump1 still interacted with half-proteasomes in the absence of Poc3 or Poc4 (Figure 6A, lower panel, and data not shown). However, in cells lacking functional Ump1, the intracellular localization of Poc3 and Poc4 proteins was modified. In wild-type cells, immunofluorescence experiments performed on Myc-tagged Poc3 or Poc4 showed a weak signal throughout the cell (Figure 6B, upper panels). By contrast, in cells deficient

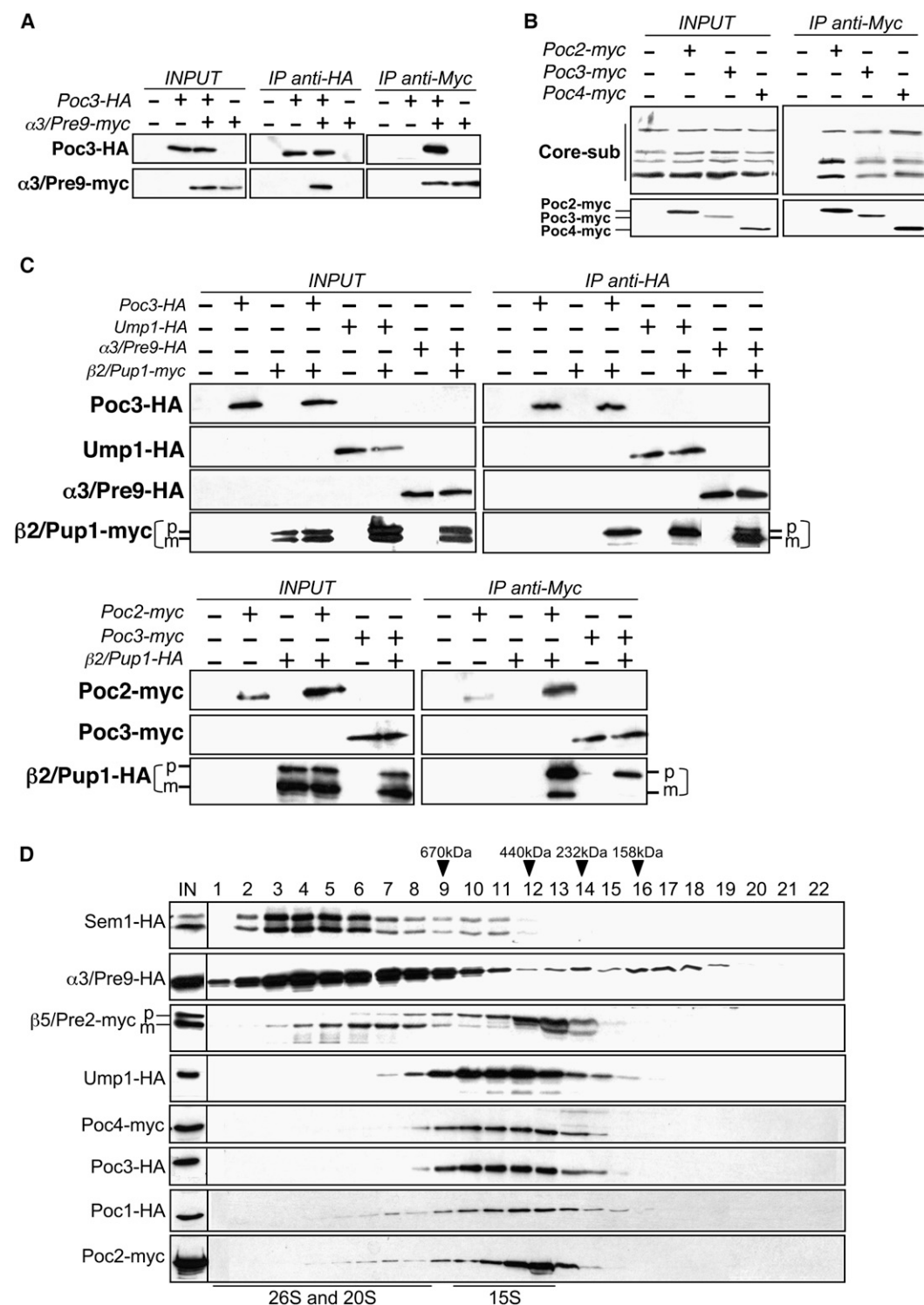


Figure 3. Poc Proteins Are Components of 20S Proteasome Precursor Complexes

(A) Lysates from strains expressing (+) or not () Poc3-HA and/or Pre9-myc were immunoprecipitated with either anti-HA or anti-Myc antibodies. Lysates (INPUT) and immunoprecipitates (IP) were analyzed by western blot as indicated on the left.

(B) Anti-Myc immunoprecipitations were performed from strains expressing Poc-myc proteins (+) or not (). Pellets (IP) were analyzed with anti-“core” subunits and anti-Myc antibodies.

for Ump1, Poc3 and Poc4 were mainly localized in the nucleus (Figure 6B, lower panels). These results show that Ump1 is involved in the normal steady-state distribution of Poc3 and Poc4 proteins. It also confirms that Poc3 and Poc4 proteins are regulated in a similar manner, reinforcing the idea that they act as a pair in vivo.

As Ump1 is quickly degraded upon proteasome maturation (Ramos et al., 1998), we next wondered if Poc3 and Poc4 were subjected to a similar regulation. Thus, we examined the half-life of epitope-tagged Poc3 and Poc4 after a cycloheximide treatment. Surprisingly, the two proteins were found to be very stable (Figure S5). Our data argue that Poc3 and Poc4 are not degraded upon proteasome assembly and that, unlike Ump1, they could be recycled. Moreover, these results suggest that they may shuttle between cytoplasm and nucleus and that this dynamics is controlled by Ump1.

Mammalian Homologs of Poc3 and Poc4 Participate in the Assembly of 20S Proteasomes

We provide computational and experimental evidence for the PAC1/2 pair being a human homolog of the Poc1/2 pair (Figure S4 and the Supplemental Discussion). Searches of the databases did not identify close homologs for Poc3 and Poc4 in higher eukaryotes. Applying an in-depth sequence search procedure as described in Becker et al. (2006), two sequences from mammals could be detected as putative homologs with high statistical significance (Figure S6). Sequence identities were found as low as 10% between Poc3 or Poc4 and their putative human homologs. We propose that human MGC10911 and mouse MGC63274 proteins are Poc3 orthologs and that human GI 57209354 and mouse GI 94395940 proteins correspond to Poc4 orthologs. While this work was in progress, the MGC10911 protein was characterized as a human 20S proteasome chaperone and named PAC3 (Hirano et al., 2006). We therefore named mPAC3 the mouse MGC63274 protein harboring 96% of sequence identity with human PAC3. We then named human and mouse Poc4 orthologs, which are 94% identical, hPAC4 and mPAC4, respectively. To experimentally confirm our computational data, we tested if PAC3 and PAC4 physically interact with the proteasomes. We used mPAC4 to investigate the behavior of the uncharacterized PAC4 protein since we have not yet obtained full-length cDNA for hPAC4. Proteasome subunits could specifically be coimmunoprecipitated with mPAC4 as well as with mPAC3 (Figure 7A), indicating that PAC4 protein, as its putative yeast Poc4 counterpart, could interact with proteasome subunits.

We have evidence that Poc3 and Poc4 act as a pair in yeast. Therefore, we tested potential interactions between mammalian PAC3 and PAC4. mPAC3 and mPAC4 tagged with either the 33 FLAG or the cMyc epitope at the N terminus were transiently cotransfected into mammalian cells. Tagged PAC3 and PAC4 efficiently coimmunoprecipitated (Figure 7B). Moreover, we found that cotransfection of mPAC4 stabilized mPAC3 proteins and vice versa (Figure 7C, compare lanes 1 and 4). When mPAC3 expression was knocked down using small interfering RNA (siRNA), we consistently observed a decrease in both mPAC3 and mPAC4 levels. Knockdown of mPAC4 was also associated with a drop of mPAC3 protein level (Figure 7C). Hence, PAC3/4 interaction has an in vivo impact on the stability of each protein.

We next tested the functional importance of PAC3 and PAC4 knockdown in human cells using specific siRNA. It turned out that PAC3 and PAC4 knockdown caused a decrease of proliferation, which was correlated with a decrease in the amount of proteasome subunits (Figure 7D and data not shown).

DISCUSSION

The DNA Damage Response Pathways Are Sensitive to Proteasomal Function

Searching for new elements of the Rad53 pathway, we uncovered the proteasome a3/Pre9 subunit, the half-proteasome chaperone Ump1, and four factors, which we named Poc1, Poc2, Poc3, and Poc4. Deletion of these genes led to hyperresistance to a subset of genotoxic agents. We also observed this phenotype in several conditional catalytic CP mutants (our unpublished data). Moreover, epistatic analyses indicated that all these genes belong to a common pathway. This highlights a striking link between proteasome function and DNA damage response, which is of particular interest since nuclear functions of proteasome remain elusive. Detailed relationships between proteasome and the sensitivity to DNA damaging agents are discussed in the Supplemental Discussion.

Although no obvious defect in proteasome assembly was detected in poc1D and poc2D cells, we did observe a hyperresistance to 4NQO in these strains. Hence, this phenotype provides a sensitive tool to detect functional impairment of the proteasome.

Poc3 and Poc4 Form a Pair of 20S Proteasome Chaperones that Is Conserved throughout Evolution

POC3 and POC4 both share several genetic features with PRE9 and UMP1: their deletion (1) alleviates RAD53-DL

(C) Coimmunoprecipitation of precursor (p) or mature (m) forms of epitope-tagged b2/Pup1 was examined by western blot analysis with the appropriate antibodies. (Upper panel) Lysates (INPUT) from strains expressing Poc3-HA, Ump1-HA, or a3/Pre9-HA in combination with b2/Pup1-myc were subjected to anti-HA immunoprecipitation (IP). (Lower panel) Lysates (INPUT) from strains expressing Poc2-Myc or Poc3-Myc in combination with b2/Pup1-HA were subjected to anti-Myc immunoprecipitation (IP).

(D) Crude extracts from strains expressing the indicated epitope-tagged versions of the proteins were fractionated by gel filtration on Superose 6. Relevant fractions were analyzed by western blot. Arrowheads indicate the positions of the peaks of marker proteins. Each experiment was carried out at least three times, and representative results are shown.

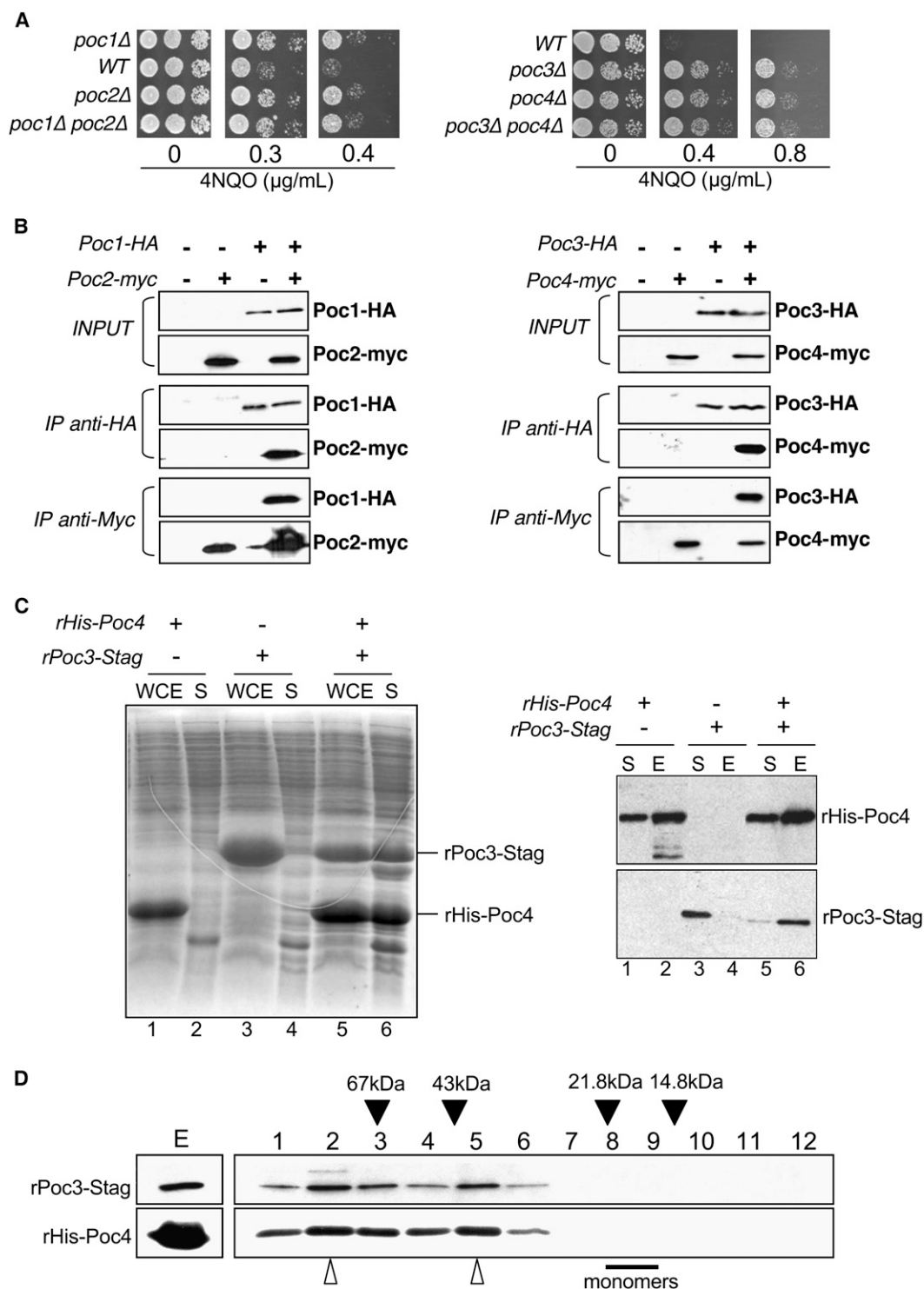


Figure 4. Poc1/Poc2 and Poc3/Poc4 Define Two Levels in the CP Maturation Pathway and Form Two Pairs

(A) Congenic deletion strains with the relevant genotypes indicated were tested for survival in the presence of various concentrations of 4NQO. See Figure 1C.

(B) Lysates from strains expressing either Poc1-HA, Poc2-myc, or both (left panel) and Poc3-HA, Poc4-myc, or both (right panel) were immunoprecipitated with either anti-HA or anti-Myc antibodies. Lysates (INPUT) and immunoprecipitates (IP) were analyzed by western blot as indicated on the right.

toxicity, (2) confers hyperresistance to 4NQO, (3) is synthetic lethal with *rpn4D*, (4) leads to synthetic growth defects with *rpn10D*, and (5) leads to hypersensitivity to canavanine. These data and epistasis analyses indicate that the *poc* mutants are impaired in proteasomal functions. Next, we have shown that Poc3 and Poc4 interact exclusively with 20S precursor intermediates. Moreover, *poc3D* and *poc4D* mutants accumulate unprocessed b2/Pup1, b5/Pre2, and b1/Pre3 and have significantly reduced proteasome activities. Thus, Poc3 and Poc4 are required for efficient maturation of yeast proteasomes. Poc3 and Poc4 efficiently coimmunoprecipitate. In vitro study of recombinant Poc3/4 proteins indicates that their interaction is direct and favors their solubility. Since the phenotypes of *poc3D*, *poc4D*, and *poc3D poc4D* are indistinguishable from one another, we conclude that Poc3 and Poc4 proteins are not interchangeable and function together to ensure proper 20S proteasome assembly.

Using an in-depth approach imposed by the high sequence divergence, we identified the recently described PAC3 (Hirano et al., 2006) and the uncharacterized PAC4 as homologs of Poc3 and Poc4, respectively. Consistently, PAC3 and PAC4 coimmunoprecipitate with each other, and both interact with proteasome subunits in mammalian cells. PAC3 is stabilized in the presence of PAC4 and vice versa, indicating that PAC3 and PAC4 are more stable in vivo when they interact with each other. These arguments strongly favor the hypothesis that PAC3 and PAC4 act together as a pair in mammalian 20S proteasome assembly. Moreover, we have observed that knock-down of PAC3 or PAC4 impairs cell growth. This result emphasizes the physiological importance of PAC3 and PAC4.

On the Hierarchic Function of the Different Factors Involved in 20S Proteasome Assembly

The hyperresistance to 4NQO is less pronounced for *poc3D* and *poc4D* cells than for *ump1D* mutants but is very close to that of *pre9D* cells, whereas *poc1D* and *poc2D* cells show a mild resistance to 4NQO compared to *poc3D* and *poc4D* cells. The same hierarchy is found concerning genetic interactions with *rpn4D* and *rpn10D*, accumulation of poly-Ub proteins, sensitivity to canavanine, and accumulation of unprocessed forms of b subunits. First, this confirms that there is a strong correlation between the strength of 4NQO hyperresistance and the severity of defects in proteasome assembly. Second, it indicates that although Poc1 and Poc2 are very likely involved in 20S proteasome maturation as described for human PAC1 and PAC2 (see the Supplemental Discussion), their functional importance in yeast is minor in an other-

wise wild-type context compared to that of Poc3 and Poc4. One can speculate that either spontaneous a-ring formation is more efficient in yeast than in mammals and/or that a-ring off-pathway dimerization is spontaneously disfavored in yeast. Nevertheless, in a pathological context (*rpn4D* at high temperatures, for example), yeast Poc1/2 function becomes limiting for growth. The importance of chaperone-assisted assembly versus self-assembly is debated in the Supplemental Discussion. Our findings point out that the hierarchy of functional importance in yeast 20S proteasome assembly is as follows: Ump1 > Poc3/4 >> Poc1/2. The relative physiological importance of 20S proteasome chaperones may be conserved from yeast to mammals (see the Supplemental Discussion).

Ump1 and the Poc Factors: Toward an Overall 20S Proteasome Assembly Model

During the CP assembly, Poc1 and Poc2 are associated with precursor forms of the proteasome, and based on their ability to coimmunoprecipitate with a fraction of mature b2/Pup1 subunits, they are likely to remain associated until completion of the 20S formation. This is reminiscent of what was observed for PAC1/2 in mammals (Hirano et al., 2005).

In some gel filtration experiments, in addition to the 15S intermediate-containing peak, we also observed a peak of variable intensity for Poc3 and Poc4 in fractions 16–18 (our unpublished data). This observation suggests that they may join proteasome intermediates before half-proteasome formation. Since mature forms of b2/Pup1 never coimmunoprecipitated with Poc3/4, we assume that Poc3 and Poc4 are released from the proteasome before the cleavage of b-precursor peptides. Despite coelution in gel filtration analysis, Ump1 and Poc3/4 coimmunoprecipitation was faint, indicating either a transient overlap between the Poc3/4 and Ump1 chaperone-containing complexes or a labile association of Poc3/4 with Ump1-15S complexes. We thus propose that Poc3 and Poc4 are associated with proteasome intermediates until Ump1 allows the succeeding steps of maturation upon its association with half-proteasomes, similarly to what was proposed for human PAC3 (Hirano et al., 2006).

In contrast to Ump1 or human PAC1/2 (Hirano et al., 2005; Ramos et al., 1998), Poc3 and Poc4 appear to be quite stable proteins. Consistently, PAC3 has a much longer half-life than PAC1/2 or hUmp1 (Hirano et al., 2006). Moreover, nuclear accumulation of Poc3 and Poc4 in *ump1* mutant cells could suggest that Ump1 is involved in the release of Poc3/4. Hence, we propose that, rather

(C) Interaction of recombinant Poc3 and Poc4. (Left panel) Coexpression increases the solubility of Poc3 and Poc4 in *E. coli* cells. Solubility of individually expressed or coexpressed recombinant Poc3-Stag (rPoc3-Stag) or 6xHis-Poc4 (rHis-Poc4) was analyzed. After SDS-PAGE, whole-cell extracts (WCE) and soluble (S) proteins were stained with Coomassie blue. (Right panel) Copurification of rPoc3/rPoc4. Soluble fractions (S) were loaded on Ni-NTA beads. Bound proteins were eluted (E) by adding imidazole, and the different fractions were analyzed by western blot using anti-His or anti-Stag antibodies. Coexpression led to increased solubilization of each protein. To get this bias round, soluble extracts from coexpressing cells (lane 6, left panel) were diluted with wild-type *E. coli* soluble extracts. The resulting diluted extracts (lane 5) were used for loading on Ni-NTA beads. (D) Purified recombinant Poc3/Poc4 from (C) were loaded on a Superdex 75 column, and fractions were analyzed by western blot. Arrowheads indicate size markers.

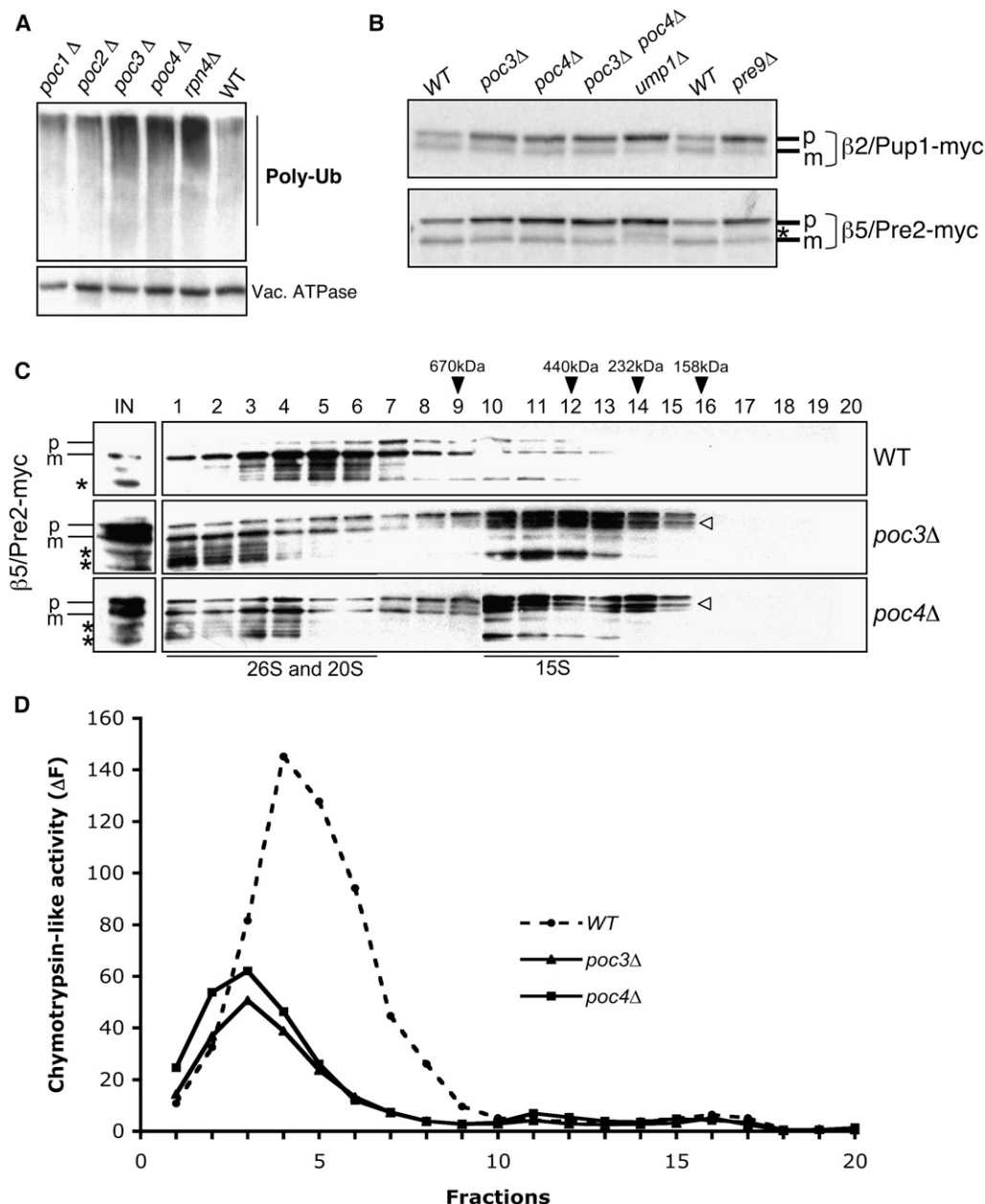


Figure 5. Poc3 and Poc4 Are Required for Efficient CP Proteasome Maturation

(A) Levels of ubiquitin conjugates in crude extracts were analyzed by anti-polyubiquitin (Poly-Ub) western blot in congenic strains, as indicated. Immunoblotting with anti-60 kDa vacuolar ATPase (Vac. ATPase) was used as a loading control.

(B) POC3, POC4, PRE9, or UMP1 was deleted in strains expressing β2/Pup1-myc (upper panel) or β5/Pre2-myc (lower panel). Whole-cell extracts of congenic strains with the relevant genotype indicated above each lane were immunoblotted with anti-Myc. Unprocessed precursors (p) and processed mature (m) forms of β subunits are indicated. The asterisk indicates processing intermediates of β5/Pre2-myc previously observed in *ump1Δ* cells (Ramos et al., 1998).

(C) SDS-PAGE and anti-Myc immunoblot analyses of Superose 6 column fractions from extracts of wild-type and congenic *poc3Δ* or *poc4Δ* cells expressing β5/Pre2-myc. Asterisks indicate degradation products. Arrowheads indicate processing intermediates of β5/Pre2. IN, input.

(D) Equal amounts of protein prepared from wild-type (WT), *poc3Δ*, and *poc4Δ* cells were loaded on Superose 6. Chymotrypsin-like activity was measured in resulting fractions.

than being regulated by proteolysis as other chaperones, Poc3/4 are regulated by a specific shuttling between cytoplasm and nucleus. There is a tight link between nucleocy-

toplasmic trafficking and yeast proteasome assembly, which has been particularly investigated for the 26S assembly (Isono et al., 2007; Lehmann et al., 2002; Tone

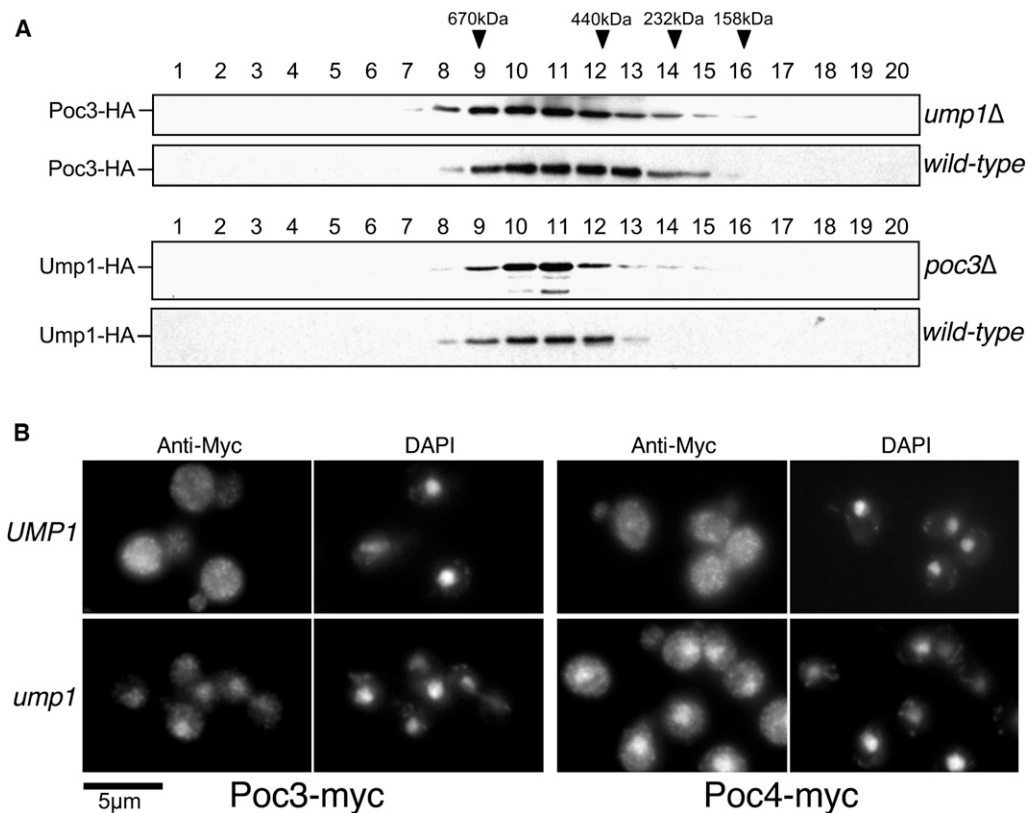


Figure 6. Steady-State Localization of Poc3 and Poc4 Is Ump1 Dependent

(A) Size-fractionated extracts were analyzed by western blot using anti-HA antibodies. Poc3-HA profile was analyzed in wild-type and *ump1Δ* cells (upper panels). Ump1-HA profile was analyzed in wild-type and *poc3Δ* strains (lower panels).

(B) Wild-type (*UMP1*) or mutant (*ump1*) strains expressing Poc3-myc (left panels) or Poc4-myc (right panels) were subjected to indirect immunofluorescence method using anti-Myc antibody. Nuclei were stained with DAPI.

and Toh, 2002). Intracellular compartmentalization of intermediates is inaccessible to *in vitro* assembly assays but constitutes an important aspect of proteasome assembly *in vivo*.

A Conserved "Pairwise" Functioning in Proteasome Assembly

In yeast as in humans, two pairs of chaperones, working at different stages, orchestrate the 20S proteasome assembly upstream of the half-proteasome maturase Ump1. It would be worth exploring if there is any structural and/or functional pressure underlying this evolutionary conserved pairwise mode of action. In the absence of one member of the Poc3/4 pair, the remaining chaperone interacts with proteasome subunits, although far less efficiently than the pair (our unpublished data). Consistently, recombinant PAC3 can bind proteasome subunits *in vitro* (Hirano et al., 2006). However, in *poc3Δ* or *poc4Δ* cells, size-fractionated extract analysis revealed prominent changes in the distribution of the remaining Poc protein, which was still partially associated with 15S fractions but was also found in heavier fractions (our unpublished data). This suggests that the release of the remaining

Poc factor from proteasome intermediates was perturbed in the absence of its partner. Hence, each protein of a pair has an intrinsic capacity to bind proteasome subunits, but the formation of the pair is required to correctly proceed any further. In this regard, it would be interesting to carefully compare the specificity of binding to proteasome subunits of each individual Poc/PAC factor versus Poc/PAC pairs. Recent advances in proteasome chaperone identification allow us to envisage such studies.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Standard Techniques

Standard techniques, yeast strains, plasmids, and RNAi sequences are described in the [Supplemental Experimental Procedures](#).

Immunoprecipitation Experiments

Yeast proteins were extracted by disrupting yeast cells in lysis buffer (50 mM Tris-HCl [pH 7.2], 0.1 M NaCl, 0.5% Igepal) with glass beads. After centrifugation at 10,000 *g* for 15 min, the resulting supernatant was used as input. HA-tagged and Myc-tagged proteins were immunoprecipitated using HA or Myc isolation kit (Milttenyi Biotec), following the manufacturer's instructions. All washes were performed using the lysis buffer.

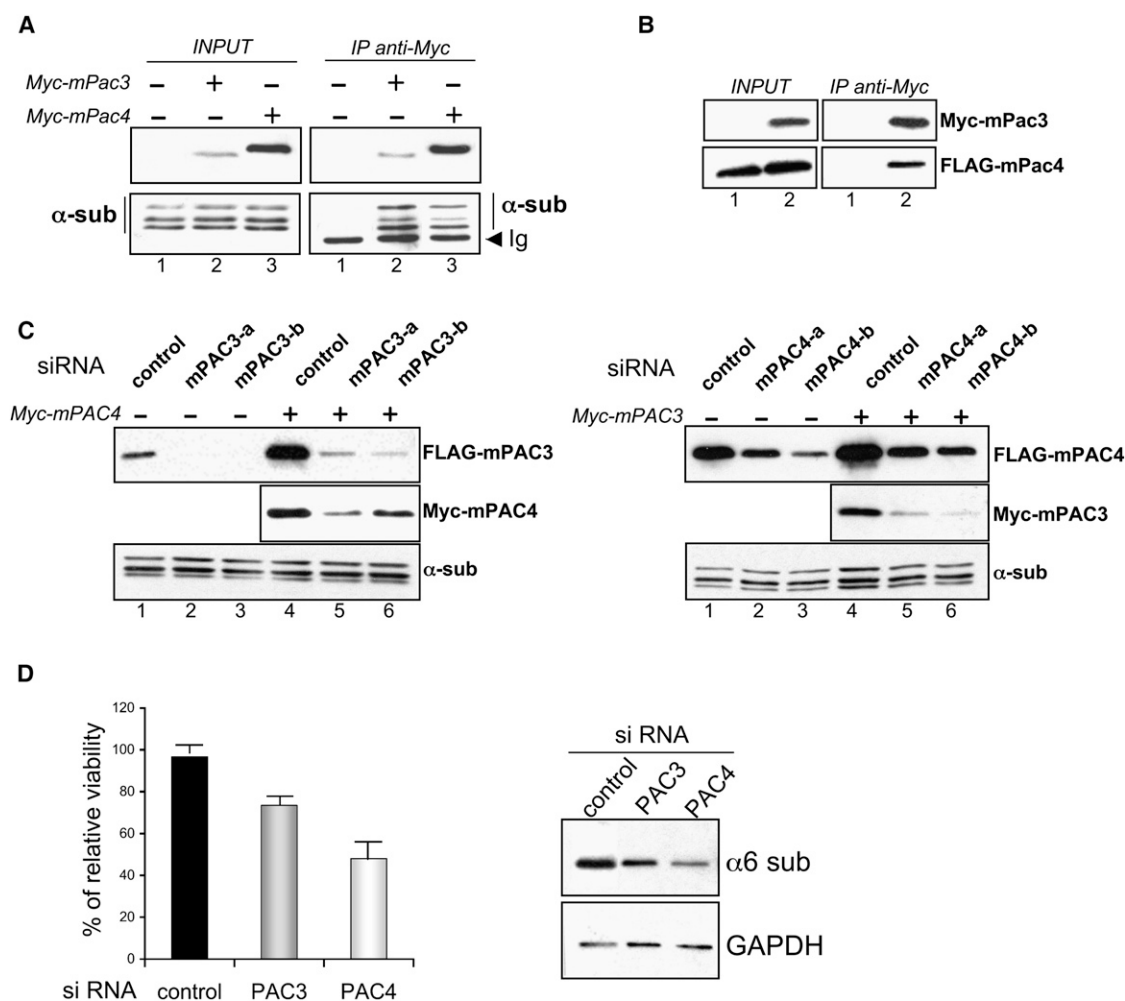


Figure 7. Mammalian Orthologs of Poc3 and Poc4 Interact with the 20S Proteasome and with Each Other

(A) Extracts from HEK293T cells transfected with pcDNA3 (lane 1), pcDNA3-myc-mPAC3 (lane 2), or pcDNA3-myc-mPAC4 (lane 3) were immunoprecipitated with anti-Myc antibodies and analyzed by western blot using anti-Myc and anti- α proteasome subunits (α -sub) antibodies. Ig, immunoglobulin chains.

(B) HEK293T cells were transfected with pcDNA3-3xFLAG-mPAC4 along with either pcDNA3 (lane 1) or pcDNA3-myc-mPAC3 (lane 2). Extracts (INPUT) were immunoprecipitated with anti-Myc antibodies. The pellet fractions were analyzed by western blot using anti-Myc or anti-FLAG M2 antibodies.

(C) In mammalian cells, PAC4 stabilizes PAC3 and vice versa. (Left panel) HEK293T cells were transfected with pcDNA3-3xFLAG-mPAC3 and with a control siRNA or mPAC3 siRNAs (mPAC3-a and mPAC3-b) in the presence (+) or the absence () of pcDNA3-3xmyc-mPAC4. (Right panel) HEK293T cells were transfected with pcDNA3-3xFLAG-mPAC4 and with a control siRNA or PAC4 siRNAs (PAC4-a and PAC4-b) in the presence (+) or the absence () of pcDNA3-3xmyc-mPAC3. Blots were also probed with anti- α subunits antibodies (α -sub).

(D) Functional impact of PAC3 and PAC4 RNAi-based gene silencing in HEK293T cells. (Left panel) PAC3 and PAC4 silencing impairs cell proliferation. Cells transfected twice with siRNA (20 mM final) at intervals of 48 hr were counted 96 hr after siRNA transfection. The bars showing the relative viability represent the mean calculated from duplicates of three independent experiments. Standard deviations are depicted above the bars. (Right panel) Relative amounts of α 6 subunit in total extracts were estimated by western blot using anti- α 6 antibody. GAPDH signal was used as a loading control.

Mammalian cells were lysed in ice-cold lysis buffer (50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 0.1 M NaCl, 0.5% Igepal, 1 mM DTT, 2 mM ATP). Extracts were subjected to centrifugation at 10,000 \times g for 15 min at 4 $^{\circ}$ C. Equal amounts of protein extracts were used for immunoprecipitation experiments as described above.

Gel Filtration Analyses

Gel filtration analyses of yeast whole-cell extracts were performed as described (Ramos et al., 1998). Yeast cells were grown at 30 $^{\circ}$ C in SD

medium to OD₆₀₀ = 1. Total extracts were prepared in a mortar in presence of liquid nitrogen using extraction buffer (50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 2 mM ATP, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 15% glycerol). After two centrifugations (20 min at 13,000 \times g, then 30 min at 60,000 \times g), protein concentration was measured in resulting supernatant. Proteins (1 mg) were fractionated on a Superose 6 column using a FPLC system (Amersham Biosciences). Elution fractions after the void volume (determined with dextran blue) were concentrated using Strataclean (Stratagene) according to manufacturer's instructions before western blot

analysis. Superose 6 column was calibrated using the following standards: thyroglobulin (669 kDa), ferritin (443 kDa), catalase (232 kDa), and aldolase (158 kDa).

Assays for Proteolytic Activities

Assays were carried out from CMY960, CMY9603, and CMY9604 cells shifted at 37  C for 5 hr. Chymotrypsin-like activity was measured as described in (Dohmen et al., 2005). One hundred fifty microliters of each gel filtration fraction was mixed with Suc-LLY-AMC (Biomol) to 100 mg/mL in a final volume of 200  L. The release of fluorescent cleaved substrate was measured at 440 nm using an excitation wavelength at 380 nm over 60 min.

Accumulation of Polyubiquitinated Proteins

Wild-type and mutant strains were grown to OD₆₀₀ = 1 in YPD at 30  C. Cells were harvested and lysed into ethanol containing 50 mM N-ethylmaleimide with glass beads as described in Laney and Hochstrasser (2002). Extracts were subjected to SDS-PAGE and analyzed by western blot using anti-ubiquitin-protein conjugates (Biomol) and anti-vacuolar ATPase 60 kDa (Molecular Probes).

Purification of Poc3/Poc4 Complex

His-Poc4 and/or Poc3-Stag were (co)expressed in *E. coli* using a pRSF-Duet-1 vector (Novagen). Transformed BL21 (DE3) cells were grown overnight at 37  C in Magic Media (Invitrogen). Whole-cell extracts correspond to bacterial cells directly lysed in Laemmli-SDS sample buffer. To separate soluble and insoluble proteins, cell pellets were lysed in buffer C (Tris 50 mM [pH 7.5], 300 mM NaCl), sonicated, and centrifuged at 10,000 g for 15 min. Supernatant (soluble fraction) and pellet (insoluble fraction) were analyzed by SDS-PAGE and Coomassie blue staining. Ni-NTA magnetic agarose beads (QIAGEN) were added to soluble fractions in the presence of 10 mM imidazole. Beads were washed with buffer C plus 20 mM imidazole. Bound proteins were eluted in the same buffer adjusted to 250 mM imidazole. Purified proteins were loaded on a Superdex 75 column.

Supplemental Data

Supplemental Data include six figures, two tables, Supplemental Discussion, Supplemental Experimental Procedures, and Supplemental References and can be found with this article online at <http://www.molecule.org/cgi/content/full/27/4/660/DC1/>.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank A. Jacquier for his generous gift of pools of deletant strains, F. Ochsenbein for her gift of purified Poc3/4 preparations, C. Mann for his gift of strains and anti-Cim3 antibodies and for his helpful comments on the manuscript, and J. Dohmen and J. Monaco for providing us proteasome tools. We thank N. Dufour for her help in culture cell experiments, J. Acker for assistance with chromatography, and Y. Ambroise for assistance with fluorimetry experiments. We are grateful to F. Leteurtre, G. Peyroche, and D. Browman for their critical reading of the manuscript and for helpful discussions. This work was financed in part by the Association pour la Recherche sur le Cancer.

Received: March 21, 2007

Revised: May 26, 2007

Accepted: June 21, 2007

Published: August 16, 2007

REFERENCES

Arendt, C.S., and Hochstrasser, M. (1997). Identification of the yeast 20S proteasome catalytic centers and subunit interactions required for active-site formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 7156–7161.

Baumeister, W., Walz, J., Zuhl, F., and Seemuller, E. (1998). The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell* 92, 367–380.

Becker, E., Meyer, V., Madaoui, H., and Guerois, R. (2006). Detection of a tandem BRCT in Nbs1 and Xrs2 with functional implications in the DNA damage response. *Bioinformatics* 22, 1289–1292.

Burri, L., Hockendorff, J., Boehm, U., Klamp, T., Dohmen, R.J., and Levy, F. (2000). Identification and characterization of a mammalian protein interacting with 20S proteasome precursors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 10348–10353.

Chen, P., and Hochstrasser, M. (1996). Autocatalytic subunit processing couples active site formation in the 20S proteasome to completion of assembly. *Cell* 86, 961–972.

Dohmen, R.J., London, M.K., Glanemann, C., and Ramos, P.C. (2005). Assays for proteasome assembly and maturation. *Methods Mol. Biol.* 301, 243–254.

Frentzel, S., Pesold-Hurt, B., Seelig, A., and Kloetzel, P.M. (1994). 20 S proteasomes are assembled via distinct precursor complexes. Processing of LMP2 and LMP7 proproteins takes place in 13–16 S preproteasome complexes. *J. Mol. Biol.* 236, 975–981.

Glickman, M.H., and Ciechanover, A. (2002). The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol. Rev.* 82, 373–428.

Griffin, T.A., Slack, J.P., McCluskey, T.S., Monaco, J.J., and Colbert, R.A. (2000). Identification of proteasomibin, a mammalian homologue of the yeast protein, Ump1p, that is required for normal proteasome assembly. *Mol. Cell Biol. Res. Commun.* 3, 212–217.

Groll, M., Bochtler, M., Brandstetter, H., Clausen, T., and Huber, R. (2005). Molecular machines for protein degradation. *ChemBioChem* 6, 222–256.

Heinemeyer, W., Fischer, M., Krimmer, T., Stachon, U., and Wolf, D.H. (1997). The active sites of the eukaryotic 20 S proteasome and their involvement in subunit precursor processing. *J. Biol. Chem.* 272, 25200–25209.

Hirano, Y., Hendil, K.B., Yashiroda, H., Iemura, S., Nagane, R., Hioki, Y., Natsume, T., Tanaka, K., and Murata, S. (2005). A heterodimeric complex that promotes the assembly of mammalian 20S proteasomes. *Nature* 437, 1381–1385.

Hirano, Y., Hayashi, H., Iemura, S., Hendil, K.B., Niwa, S., Kishimoto, T., Kasahara, M., Natsume, T., Tanaka, K., and Murata, S. (2006). Co-operation of multiple chaperones required for the assembly of mammalian 20S proteasomes. *Mol. Cell* 24, 977–984.

Isono, E., Nishihara, K., Saeki, Y., Yashiroda, H., Kamata, N., Ge, L., Ueda, T., Kikuchi, Y., Tanaka, K., Nakano, A., and Toh, E.A. (2007). The assembly pathway of the 19S regulatory particle of the yeast 26S proteasome. *Mol. Biol. Cell* 18, 569–580.

Laney, J.D., and Hochstrasser, M. (2002). Assaying protein ubiquitination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol.* 351, 248–257.

Lehmann, A., Janek, K., Braun, B., Kloetzel, P.M., and Enenkel, C. (2002). 20 S proteasomes are imported as precursor complexes into the nucleus of yeast. *J. Mol. Biol.* 317, 401–413.

Li, X., Kusmierczyk, A.R., Wong, P., Emili, A., and Hochstrasser, M. (2007). beta-Subunit appendages promote 20S proteasome assembly by overcoming an Ump1-dependent checkpoint. *EMBO J.* 26, 2339–2349.

London, M.K., Keck, B.I., Ramos, P.C., and Dohmen, R.J. (2004). Regulatory mechanisms controlling biogenesis of ubiquitin and the proteasome. *FEBS Lett.* 567, 259–264.

Marsolier, M.C., Roussel, P., Leroy, C., and Mann, C. (2000). Involvement of the PP2C-like phosphatase Ptc2p in the DNA checkpoint pathways of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 154, 1523–1532.

Melo, J., and Toczyski, D. (2002). A unified view of the DNA-damage checkpoint. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14, 237–245.

- Murata, S. (2006). Multiple chaperone-assisted formation of mammalian 20S proteasomes. *IUBMB Life* 58, 344–348.
- Nandi, D., Woodward, E., Ginsburg, D.B., and Monaco, J.J. (1997). Intermediates in the formation of mouse 20S proteasomes: implications for the assembly of precursor beta subunits. *EMBO J.* 16, 5363–5375.
- Pan, X., Ye, P., Yuan, D.S., Wang, X., Bader, J.S., and Boeke, J.D. (2006). A DNA integrity network in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* 124, 1069–1081.
- Ramos, P.C., Hockendorff, J., Johnson, E.S., Varshavsky, A., and Dohmen, R.J. (1998). Ump1p is required for proper maturation of the 20S proteasome and becomes its substrate upon completion of the assembly. *Cell* 92, 489–499.
- Ramos, P.C., Marques, A.J., London, M.K., and Dohmen, R.J. (2004). Role of C-terminal extensions of subunits beta2 and beta7 in assembly and activity of eukaryotic proteasomes. *J. Biol. Chem.* 279, 14323–14330.
- Schmidtke, G., Kraft, R., Kostka, S., Henklein, P., Frommel, C., Lowe, J., Huber, R., Kloetzel, P.M., and Schmidt, M. (1996). Analysis of mammalian 20S proteasome biogenesis: the maturation of beta-subunits is an ordered two-step mechanism involving autocatalysis. *EMBO J.* 15, 6887–6898.
- Schmidtke, G., Schmidt, M., and Kloetzel, P.M. (1997). Maturation of mammalian 20 S proteasome: purification and characterization of 13 S and 16 S proteasome precursor complexes. *J. Mol. Biol.* 268, 95–106.
- Seemuller, E., Lupas, A., and Baumeister, W. (1996). Autocatalytic processing of the 20S proteasome. *Nature* 382, 468–471.
- Tone, Y., and Toh, E.A. (2002). Nob1p is required for biogenesis of the 26S proteasome and degraded upon its maturation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* 16, 3142–3157.
- Velichutina, I., Connerly, P.L., Arendt, C.S., Li, X., and Hochstrasser, M. (2004). Plasticity in eucaryotic 20S proteasome ring assembly revealed by a subunit deletion in yeast. *EMBO J.* 23, 500–510.
- Witt, E., Zantopf, D., Schmidt, M., Kraft, R., Kloetzel, P.M., and Kruger, E. (2000). Characterisation of the newly identified human Ump1 homologue POMP and analysis of LMP7(beta 5i) incorporation into 20 S proteasomes. *J. Mol. Biol.* 301, 1–9.
- Witt, S., Kwon, Y.D., Sharon, M., Felderer, K., Beuttler, M., Robinson, C.V., Baumeister, W., and Jap, B.K. (2006). Proteasome assembly triggers a switch required for active-site maturation. *Structure* 14, 1179–1188.
- Wolf, D.H., and Hilt, W. (2004). The proteasome: a proteolytic nanomachine of cell regulation and waste disposal. *Biochim. Biophys. Acta* 1695, 19–31.
- Xie, Y., and Varshavsky, A. (2001). RPN4 is a ligand, substrate, and transcriptional regulator of the 26S proteasome: a negative feedback circuit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 3056–3061.
- Zhou, B.B., and Elledge, S.J. (2000). The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* 408, 433–439.
- Zwickl, P., Kleinz, J., and Baumeister, W. (1994). Critical elements in proteasome assembly. *Nat. Struct. Biol.* 1, 765–770.

Molecular Cell, Volume 27

Supplemental Data

20S Proteasome Assembly

Is Orchestrated by Two Distinct Pairs

of Chaperones in Yeast and in Mammals

Benoît Le Tallec, Marie-Bénédicte Barrault, Régis Courbeyrette, Raphaël Guérois, Marie-Claude Marsolier-Kergoat, and Anne Peyroche

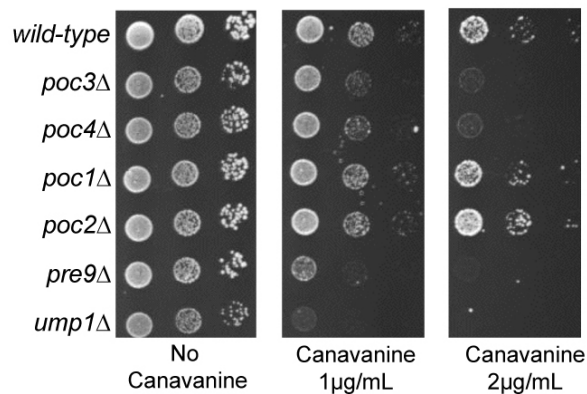


Figure S1. *poc3Δ* and *poc4Δ* cells are hypersensitive to canavanine

Strains with relevant genotype indicated on the left were spotted onto SD plates containing indicated concentrations of canavanine and incubated for 4 days at 30°C.

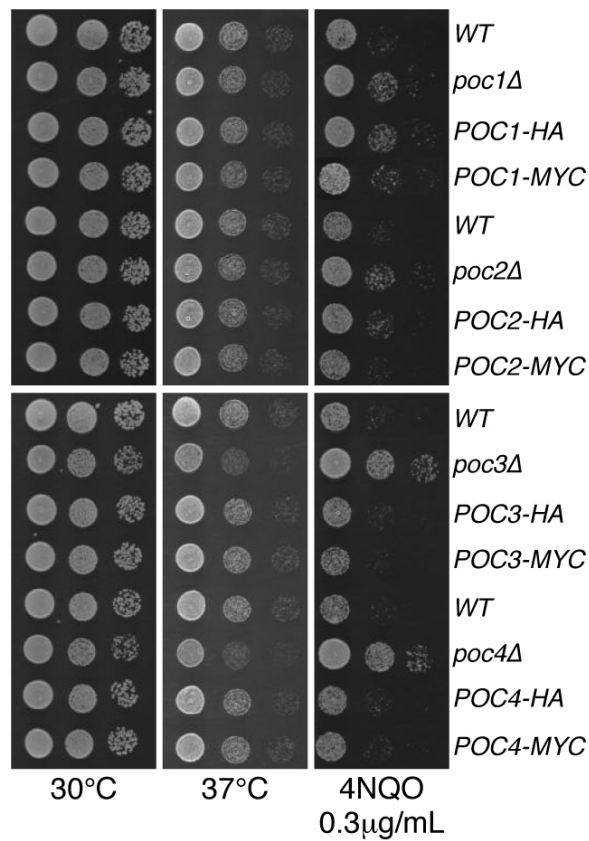


Figure S2. Functionality of the epitope-tagged Poc proteins in *S. cerevisiae*

Ten fold serial dilutions of the indicated strains were spotted onto YPD plates with no drug or with 4NQO (0.3µg/mL). Plates were incubated at 37°C for 1 day or at 30°C with or without 4NQO for 2 days.

	CP					RP subunits			
	Ump1	Poc1	Poc2	Poc3	Poc4	Pre9	Sem1	Rpn10	Cim3
Ump1		++	++	+	+	++	-	nd	nd
Poc1	++		+++	+/-	+/-	++	nd	nd	nd
Poc2	++	+++		+/-	+/-	++	nd	nd	nd
Poc3	+	+/-	+/-		+++	++	-	-	-
Poc4	+	+/-	+/-	+++		++	nd	nd	nd
Pre9	++	++	++	++	++		+	nd	+
Sem1	-	nd	nd	+/-	nd	+		+++	+++
Rpn10	-	nd	nd	-	nd	nd	+++		nd

Figure S3. Interactions between Poc factors and proteasome subunits or Ump1

Co-immunoprecipitations were carried out as described in Experimental Procedures. For clarity, used epitope was not mentioned. Most of the experiments were done with two distinct epitopes (except for Ump1 and Rpn10). Cim3 was detected with a polyclonal anti-CIM3 antibody (a kind gift of C. Mann). The relative level of detection in co-immunoprecipitations is estimated (very strong (+++); strong (++); mean (+); mild (+/-); nd : not determined).

In the conditions we used, we observed a strong CP-RP dissociation: α 3/Pre9 CP subunit inefficiently retained Sem1 or Cim3 (RP subunits) and *vice versa*. Meanwhile, co-immunoprecipitation was very efficient between two subunits located within either the CP or the RP.

A.

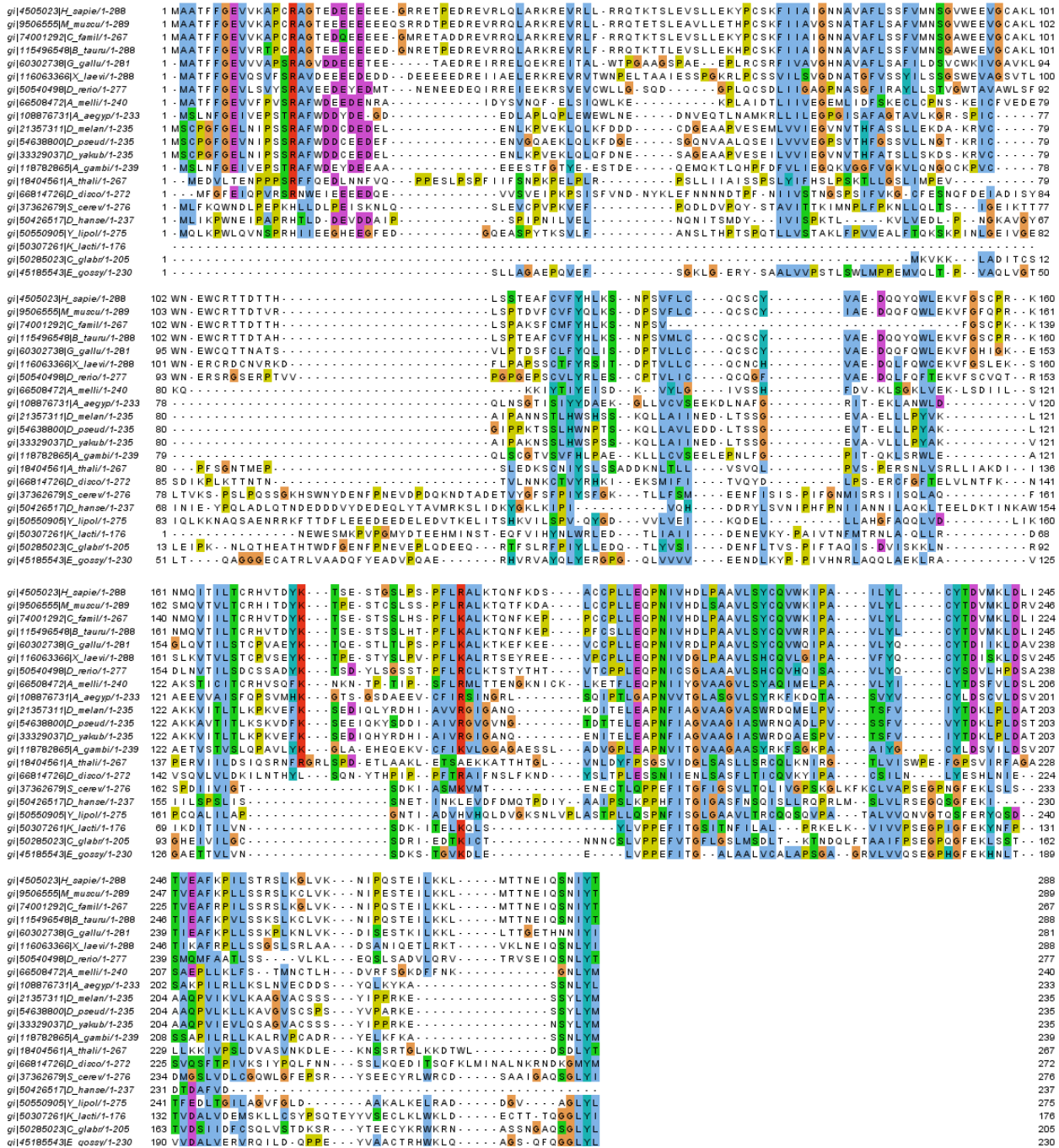


Figure S4. Alignment of PAC1 and PAC2

A. Alignment of PAC1

From the human PAC1 (gi: 4505023) and the *S. cerevisiae* YLR199C (gi: 37362679) sequences, two sets of 15 and 6 homologous sequences were detected using PSI-BLAST (Altschul et al., 1997; Schaffer et al., 2001) ran on the nr database (version December 2006). Draft multiple sequence alignments of the full length sequences were generated using the Kalign algorithm (Lassmann and Sonnhammer, 2005) and further refined manually based on secondary structure predictions. Both alignments were compared using the profile-profile HMM-based comparison algorithm HHsearch (Soding, 2005) with secondary structures predicted using PSIPRED (Jones, 1999). The high probability of 89 % and e-value of 2.10^{-5} obtained from the HHsearch calculation supported that both set of sequences are evolutionary related.

B.

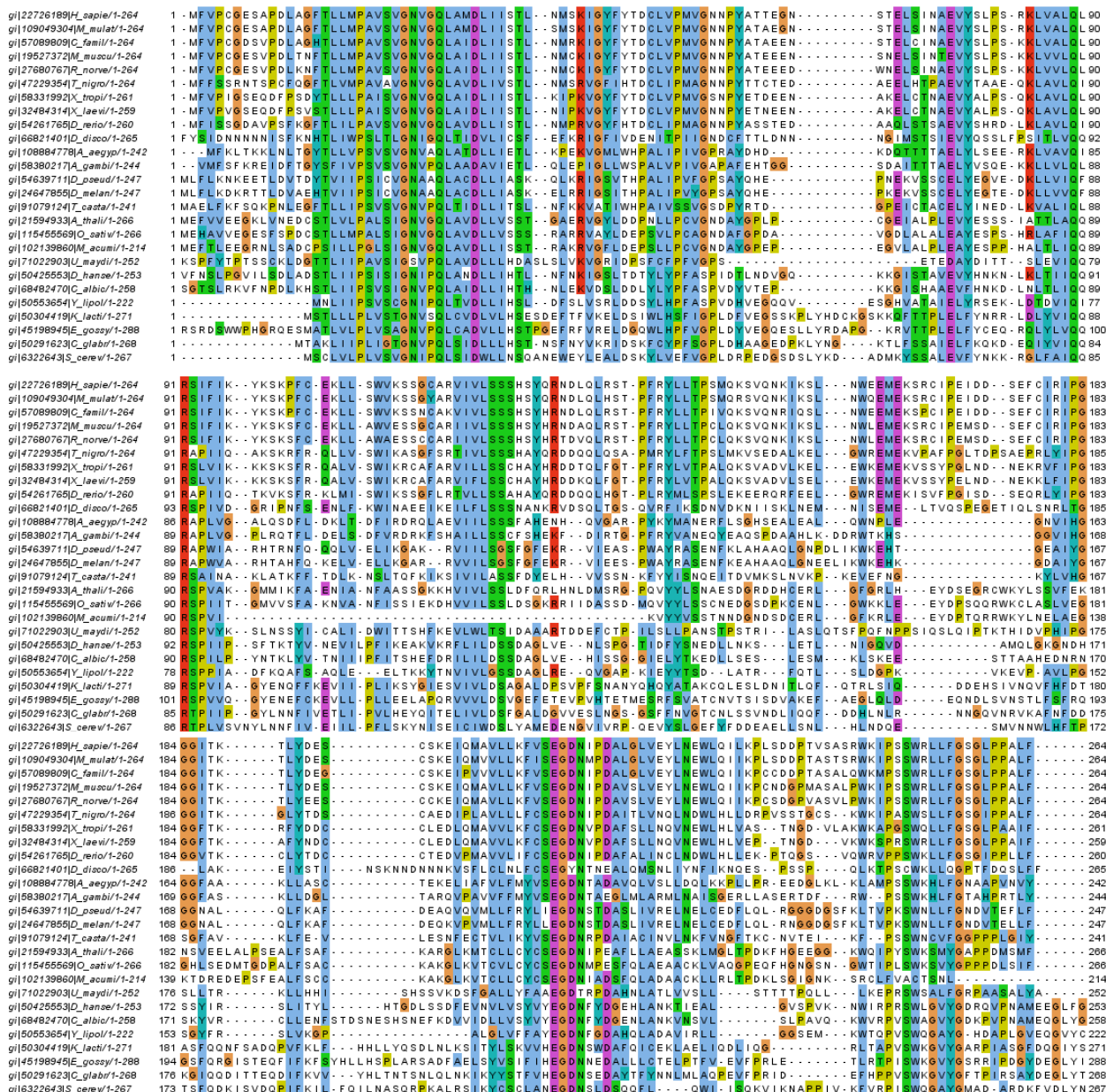


Figure S4. Alignment of PAC1 and PAC2

B. Alignment of PAC2

From the human PAC2 (gi: 22726189) 26 homologous sequences, including the *S. cerevisiae* YKL206C (gi: 6322643), were detected using PSI-BLAST (Altschul et al., 1997; Schaffer et al., 2001) ran on the nr database (version December 2006). A draft multiple sequence alignments of the full length sequences was generated using the Kaligin algorithm (Lassmann and Sonnhammer, 2005) and further refined manually.

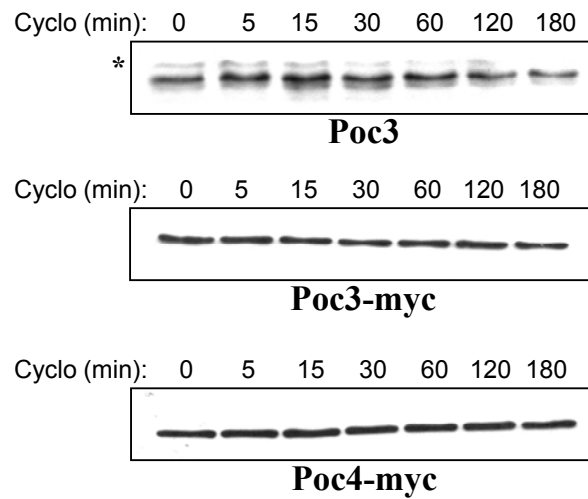


Figure S5. Poc3 and Poc4 are stable proteins

Cells expressing wild-type or epitope-tagged Poc3 and Poc4 were grown to early exponential phase in YPD at 30°C. Cycloheximide (Cyclo) (20µg/mL) was added and equal amount of cells was taken at the indicated time. Proteins were extracted using TCA precipitation method and visualized by Western blotting using an appropriate antibody (anti-Poc3 or 9E10 anti-Myc). Asterisk indicates non-specific protein band cross-reacting.

gi|60475779|D.discoideum/1-145 85

g163c230c915	GeeW/-1-178	77	G G D Y V D E E E F V R D H L S D	N O V U T I L A P O S . . . A D K P V C V C V I J A L T E R A V I L F E N S G E T M A Q J N M D F S T L L S M S K S I A
g14r4980101a	gossyp10/-1-177	78	L R A G E N D E E F V E D H L K S	. . . N M S M M G S . . . N D M K P V M M I A E L S E R A V F S L T G E A R A G D L L T L T S R
g1503131509k	lact1/-1-158	66	D S . . . D V A N V L S H	. . . N D M K P I I C T I A Q L S E R A V F S L T G . . . S E V S A S P D V I L T S R
g14r2922466fC	glab1eaf/-1-170	76	S G E I D E E T E R T Y L A D K V A R L G G . . .	O D P K M K I V S G I A E L N M Q M G D E L . . . R V N I V S L S R L L A T L S R
g14r373266fC	albicant/-1-169	76	D D D H . . . E Q E E F R E R V I P E L I L I G H . . .	D N K M I V A T I S K I S I N . . . C P L I S G S W M . . . E B L N I S G S R M V
g14r965733D	farnesin/-1-141	71	. . . G V E V I L I G G Y . . . S L D I G Q I A V A S V Q V K D S T . . .	E V T F T L S G S R M V
g14r965733V	lyophilic/-1-139	77	. . . L M S L I G S . . . N D I G Q I A V A S V Q V K D S T . . .	E V T F T L S G S R M V
g14r7382323A	nidulant/-1-151	68	. . . F A T L L G R S . . . P G E I V I G Q L A R I A A I V K T N . . .	E N R L V G L Q I D K K
g190273986C	mimifur/-1-145	81	. . . F A T L L G R S . . . G E L E I V I G Q L A R I A A I V K T N . . .	E N R L V G L Q I D K K
g135934060fH	gibber/-1-146	81	. . . L A T L L G S G . . . D E E I I G Q L A A A S E L S T R I N D . . .	E R T L V G L Q I D K K
g14r2862201G	saeef/-1-144	81	. . . L P T L F P G G G . . . E E E I I G Q L A A A S G I O L S R D . . .	E R T L V G L Q I D K K
g126892323Y	cassia/-1-144	80	. . . L A T T L F P G G G . . . A E E I I G Q L A A A S E L T L R I N . . .	E R S L L V G L Q I D K K
g14r609387U	unayel/-1-165	78	. . . S T R I P I G E S . . . P S T A L V O L V A A A S I V L H S A G . . .	E O A R P V S L A P K
g172825208D	wellingstater/-1-126	66	V S P I M K N C L G L D T E R I A I O C L V M R L K H K F . . .	T E V V G L Q I D K K
g15c464767D	josephdobsonii/-1-114	66	. . . I S P I I G S C L . . . G V T V D D I C A I O C L V M N K L W S E . . .	M D V I G L Q I D K K
g15r7087566fC	familial/-1-122	62	. . . L T R V L L G . . . D E P L H F A K L V F V S Q E A N . . .	R A V U L A L A K D
g11289477M	musculis/-1-122	62	. . . L T R V L L G . . . D E P L H F A K L V F V S Q E A D . . .	R A V U L A M A X E D
g127865208R	novoguineus/-1-122	62	. . . L T R V L L G . . . D E P L H F A K L V F V S Q E A D . . .	R A V U L A M A X E D
g152790730H	azobari/-1-122	62	. . . L T R V L L G . . . D E P L H F A K L V F V S Q E A N . . .	R A V U L A V A K D
g18r420200fB	tatuni/-1-122	62	. . . L T R V L L G . . . D E P L H F A K L V F V S Q E A N . . .	R A V U L A V A K D
g15050401	2BD mof/-1-122	62	. . . L T R V L L G . . . D E P L H F A K L V F V S Q E A N . . .	R A V U L A V A K D
g150756502G	glab1eaf/-1-122	62	. . . L T R V L L G . . . D E P L H F A K L V F V S Q E A N . . .	R A V U L A V A K D
g173870854V	zahar/-1-120	60	. . . M S Y S F G R . . . D E P L L A C A R I L E I S G S G A . . .	P S I M S G L D
g173870854V	zahar/-1-120	60	. . . M S Y S F G R . . . D E P L L A C A R I L E I S G S G A . . .	P S I M S G L D

[illegible]

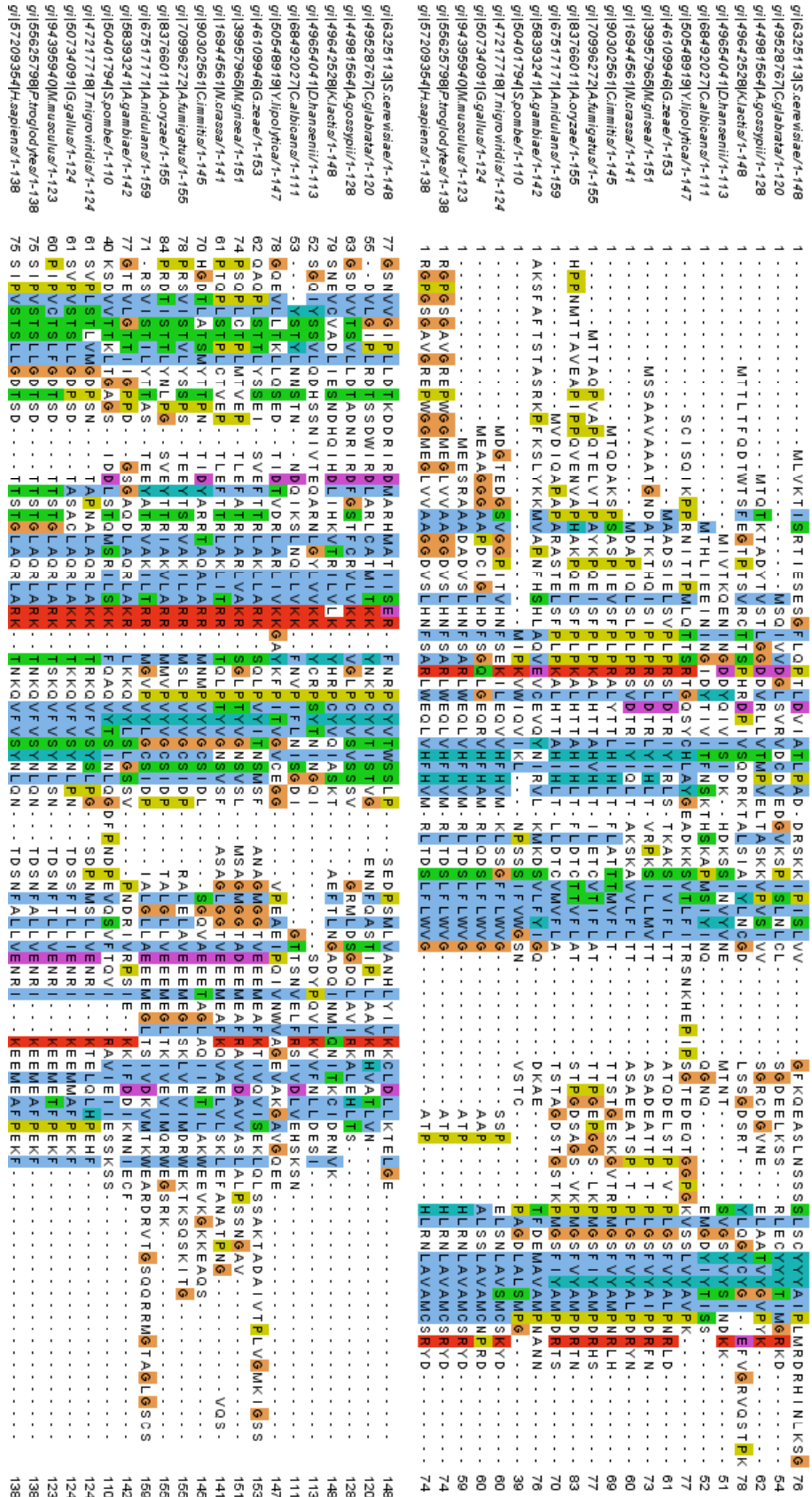


Fig S6. Alignment of PAC3 and PAC4

B.. Alignment of PAC4. An initial profile containing *S. cerevisiae* YPL144W (gi: 6325113) close homologs was used as a seed for the PSI-BLAST search procedure ran on the nr database (version December 2006). After 7 iterations, the procedure converged with 21 sequences, including a putative human homolog (gi: 57209354) of YPL144W. A draft multiple sequence alignments of the full length sequences was generated using the Kalign algorithm [Lassmann T, Sommer EL. BMC Bioinformatics. 2005 Dec 12;6:298] and further refined manually.

Table S1. Strains used in this study

Strain	Genotype	Reference
BLT12	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 trp1::P α-NATMX4-TRP1-TetO</i>	This study
BLT15	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 trp1::P α-NATMX4-TRP1-TetO-RAD53-GFP</i>	This study
BLT151	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 trp1::P α-NATMX4-TRP1-TetO-RAD53-GFP poc1::KANMX4</i>	This study
BLT152	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 trp1::P α-NATMX4-TRP1-TetO-RAD53-GFP poc2::KANMX4</i>	This study
BLT153	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 trp1::P α-NATMX4-TRP1-TetO-RAD53-GFP poc3::KANMX4</i>	This study
BLT154	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 trp1::P α-NATMX4-TRP1-TetO-RAD53-GFP poc4::KANMX4</i>	This study
BLT156	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 trp1::P α-NATMX4-TRP1-TetO-RAD53-GFP pre9::KANMX4</i>	This study
BLT157	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 trp1::P α-NATMX4-TRP1-TetO-RAD53-GFP ump1::KANMX4</i>	This study
BLT159	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 trp1::P α-NATMX4-TRP1-TetO-RAD53-GFP poc3::KANMX4 pre9::HPHMX4</i>	This study
BLT63	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 poc3::HPHMX4</i>	This study
BLT64	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 poc4::HPHMX4</i>	This study
BLT66	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 pre9::HPHMX4</i>	This study
BLT67	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 ump1::HPHMX4</i>	This study
BLT68	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 poc1::HPHMX4</i>	This study
BLT69	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 poc2::HPHMX4</i>	This study
BLT70	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 ump1::HPHMX4 poc1::KANMX4</i>	This study
BLT71	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 ump1::HPHMX4 poc2::KANMX4</i>	This study
BLT72	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 ump1::KANMX4 poc3::HPHMX4</i>	This study
BLT73	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 ump1::HPHMX4 poc4::KANMX4</i>	This study
BLT74	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 rpn10::KANMX4 poc3::HPHMX4</i>	This study
BLT75	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 rpn10::KANMX4 poc4::HPHMX4</i>	This study
BLT76	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 rpn10::KANMX4 pre9::HPHMX4</i>	This study
BLT78	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 rpn4::KANMX4 poc1::KANMX4</i>	This study
BLT79	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 rpn4::KANMX4 poc2::KANMX4</i>	This study
BLT80	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 POC3-3HA-HIS3</i>	This study
BLT81	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 UMP1-3HA-HIS3</i>	This study
BLT82	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 PRE9-3HA-HIS3</i>	This study
BLT83	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 POC1-3HA-HIS3</i>	This study
BLT84	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 SEM1-3HA-HIS3</i>	This study
BLT85	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 PUP1-3HA-HIS3</i>	This study
BLT86	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 POC3-13MYC-KANMX4</i>	This study
BLT87	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 POC4-13MYC-KANMX4</i>	This study
BLT88	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 PRE9-13MYC-KANMX4</i>	This study
BLT89	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 POC2-13MYC-KANMX4</i>	This study
BLT90	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 PUP1-13MYC-KANMX4</i>	This study
BLT91	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 PRE2-13MYC-KANMX4</i>	This study
BLT92	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 PRE2-13MYC-KANMX4 poc3::HPHMX4</i>	This study
BLT93	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 PRE2-13MYC-KANMX4 poc4::NATMX4</i>	This study
BLT94	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 PRE2-13MYC-KANMX4 poc3::HPHMX4 poc4::NATMX4</i>	This study
BLT95	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 PRE2-13MYC-KANMX4 ump1::HPHMX4</i>	This study
BLT96	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 PRE2-13MYC-KANMX4 pre9::HPHMX4</i>	This study
BLT97	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 PUP1-13MYC-KANMX4 poc3::HPHMX4</i>	This study
BLT98	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 PUP1-13MYC-KANMX4 poc4::NATMX4</i>	This study
BLT99	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 PUP1-13MYC-KANMX4 poc3::HPHMX4 poc4::NATMX4</i>	This study
BLT100	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 PUP1-13MYC-KANMX4 ump1::HPHMX4</i>	This study
BLT101	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 PUP1-13MYC-KANMX4 pre9::HPHMX4</i>	This study
BLT102	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 POC3-3HA-HIS3 ump1::HPHMX4</i>	This study
BLT103	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 UMP1-3HA-HIS3 poc3::HPHMX4</i>	This study
BLT104	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 POC3-13MYC-KANMX4 ump1::HPHMX4</i>	This study
BLT105	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 POC4-13MYC-KANMX4 ump1::HPHMX4</i>	This study
BLT106	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 poc3::HPHMX4 poc4::KANMX4</i>	This study
BLT107	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 POC3-3HA-HIS3 PRE9-13MYC-KANMX4</i>	This study
BLT108	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 POC3-3HA-HIS3 PUP1-13MYC-KANMX4</i>	This study
BLT109	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 UMP1-3HA-HIS3 PUP1-13MYC-KANMX4</i>	This study
BLT110	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 PRE9-3HA-HIS3 PUP1-13MYC-KANMX4</i>	This study
BLT111	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 PUP1-3HA-HIS3 POC2-13MYC-KANMX4</i>	This study
BLT112	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 PUP1-3HA-HIS3 POC3-13MYC-KANMX4</i>	This study
BLT113	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 POC1-3HA-HIS3 POC2-13MYC-KANMX4</i>	This study
BLT114	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 POC3-3HA-HIS3 POC4-13MYC-KANMX4</i>	This study
AP225A2	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 poc1::KANMX4 poc2::HPHMX4</i>	This study
BY4742	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i>	EUROSCARF
BY4741 <i>rpn4Δ</i>	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 rpn4::KANMX4</i>	EUROSCARF
BY4741 <i>rpn10Δ</i>	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 rpn10::KANMX4</i>	EUROSCARF
CMY960	<i>MATα his3-11,15 leu2-3,112 ura3</i>	Our stock
CMY9603	<i>MATα his3-11,15 leu2-3,112 ura3 poc3::HPHMX4</i>	This study
CMY9604	<i>MATα his3-11,15 leu2-3,112 ura3 poc4::HPHMX4</i>	This study

Deletions and epitope-coding segments were introduced as described in Longtine, M. S., McKenzie, A., 3rd, Demarini, D. J., Shah, N. G., Wach, A., Brachat, A., Philippsen, P., and Pringle, J. R. (1998). Yeast 14, 953-961 and Goldstein, A. L., and McCusker, J. H. (1999). Yeast 15, 1541-1553.

Table S2. RNAi sequences used in this study	
Name	Sequence
mPAC3-a	5' GCCAUGGCUGUGAAAGACAAGAGCA 3'
mPAC3-b	5' GGCUCAAGGCAUUGAAGGAAGUGAU 3'
mPAC4-a	5' GCUUCACAACUUCAGUGCAAGGCUG 3'
mPAC4-b	5' GGAGACACUUCUGAUACAACUCCA 3'
PAC3	5' UUGAGACACAAACGCUACCAGGUUC 3'
PAC4	5' CCAGGAAGACCAACAAACAGGUGUU 3'

Stealth SiRNA targeting mPAC3, mPAC4, PAC3 and PAC4 were designed using Block-iT RNAi designer and were purchased from INVITROGEN. Control siRNA (Stealth RNAi Negative control Medium GC) was purchased from INVITROGEN.

Supplemental Discussion

Proteasome and sensitivity to DNA damage

In this study, we show that some 20S proteasome assembly mutants are hyperresistant to 4NQO and Cpt. We tested this phenotype in at least three independent backgrounds. Moreover, this phenotype was reversed by the reintroduction of the corresponding wild-type genes on CEN-based plasmids (our unpublished results). By contrast, none of these strains displays hyperresistance towards UV-C irradiation, hydroxyurea (a ribonucleotide reductase inhibitor), benomyl (a microtubule-depolymerizing drug) or hyperosmotic stress. Hence, the hyperresistance is restricted to some specific genotoxic agents.

The 19S proteasome mutant *rpn4Δ* has clearly been shown to be hypersensitive to several genotoxic stresses (London et al., 2004). We also observed that *rpn4Δ* strain is hypersensitive to various genotoxic insults, including 4NQO and Cpt (our unpublished results). Hypersensitivity to genotoxic agents has also been observed in double-mutant strains combining either several 19S proteasome subunit mutations or 19S proteasome mutations with DNA repair mutations (Krogan et al., 2004).

Concerning 20S proteasome mutants, *pre9Δ* cells have been reported to be hypersensitive to hydroxyurea (Funakoshi et al., 2004) but this phenotype was not observed by others (Krogan et al., 2004). Besides, PRE9 deletion has been shown to exacerbate hydroxyurea and MMS sensitivity of the *rad55Δ* DNA repair mutant cells (Krogan et al., 2004). *ump1Δ* cells appeared hypersensitive to UV but not to MMS (Mieczkowski et al., 2000). By contrast, another group reported that *UMP1* deletion as well as mutations in *PUP1* or *PRE4* led to a slight sensitivity to MMS treatment (London et al., 2004).

Therefore, relationships between the DNA damage response and the proteasome are complex and could reflect multiple roles of the proteasome in this pathway. The sensitivity of 20S proteasome mutants or *ump1* mutants towards 4NQO or Cpt has never been extensively investigated before this study. Our report indicates that these relationships should be carefully examined for each type of proteasome mutant and each type of DNA damage agent.

Poc1/2 pair is the yeast counterpart of the human PAC1/PAC2 chaperone-pair

The existence of homologs of human PAC1 (hPAC1) in *S. cerevisiae* has remained elusive due to high sequence divergence. Using a specific search strategy similar to that recently published (Becker et al., 2006), we identified Poc1 as a putative homolog of hPAC1 (Fig S4A). We also revealed a structural similarity between Poc2 and hPAC2 (Fig S4B) besides the sequence

similarity previously mentioned (Hirano et al, 2005). Remarkably, sequence identity between hPAC1 and yeast Poc1 is as low as 7 % and reaches only 14 % between hPAC2 and *S. cerevisiae* Poc2. Given the physical association of Poc1/2 with precursor forms of 20S proteasome and the synthetic effect of their deletion in a *rpn4Δ* strain in addition to their contribution in 4NQO sensitivity, the Poc1/Poc2 pair is likely functionally related to the human PAC1/PAC2 pair that promotes the assembly of mammalian 20S proteasome. More specifically, we show that Poc1 as well as Poc2 interact with both precursors and mature forms of 20S proteasome and that they strongly interact with each other as PAC1 and PAC2 do. Poc1 and Poc2 have also been shown to interact with some CP subunits in global analysis of protein complexes (Krogan et al., 2006). Additional biochemical evidence that Poc1/2 form a pair of 20S proteasome chaperones homologous to PAC1/2 was published while this manuscript was under review (Li et al., 2007). Besides, *poc2Δ* has been previously identified as *add66* mutant deficient for endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD), a pathway involving proteasome (Palmer et al., 2003). Altogether, these data indicate that the Poc1/2 pair is the functional homolog of PAC1/2 however, we failed to complement *poc1Δ* or *poc2Δ* hyperresistance to 4NQO by overexpressing *PAC1* or *PAC2* respectively. Similarly, mammalian UMP1 and yeast Ump1, although clearly functionally related, are not interchangeable (Burri et al., 2000).

Self-assembly versus chaperone-dependent assembly

Although under particular conditions (high temperature, protein biosynthesis perturbation, etc.), the yeast 20S proteasome assembly chaperones are required for survival, none of them is strictly essential ((Ramos et al., 1998) and this study). Moreover, no additive effects are observed when several chaperone genes are deleted (this study and our unpublished results). In contrast, all CP subunits, except $\alpha 3$, are essential. This indicates that, in yeast, spontaneous proteasome assembly produces enough mature 20S proteasome for growth under standard conditions. In *ump1Δ* cells, Rpn4-mediated up-regulation of proteasome subunits biosynthesis compensates the decrease in correctly assembled proteasome and allows growth under non-stressed conditions (London et al., 2004). We also observe an increase of proteasome subunits synthesis in *poc3Δ* and *poc4Δ* mutants. In addition, the reduction of synthesis of proteasome subunits in *rpn4Δ* context is detrimental in the absence of any Poc factors. Hence, increased levels of proteasome subunits biosynthesis may favor self-assembly by mass action and thus overcome the absence of chaperones.

An important role for proteasome chaperones might be to suppress the formation of non-productive “off-pathways” by keeping intermediates competent for the next step of assembly or

to prevent misassembled intermediates from being used for subsequent steps of assembly. They might even participate in the resolution of specific abnormal intermediates. Proteasome chaperones might ensure a “quality control” mechanism minimizing the missassembly during 20S proteasome self-assembly. Cell growth in the absence of a given chaperone might then reflect the rate of successful self-assembly at the stage involving this chaperone.

In this context, it would not be surprising that the recruitment of a particular chaperone could be independent of the presence of upstream chaperones. Consistently, the interaction between proteasome subunits and Poc3/4 is independent of Ump1, and the Ump1-proteasome interaction does not require Poc3/4.

Poc3/PAC3 and β -subunits

We have observed co-immunoprecipitation of Poc3/4 with complexes containing precursor forms of β -subunits. However, no PAC3 interaction with β -subunits was found *in vivo*, although it binds several β -subunits *in vitro*, particularly two of the three identified in 13S intermediates (Hirano et al., 2006). Why such a discrepancy? β -precursors are easily detected in wild type yeast cells in contrast to mammalian cells, suggesting that in yeast some assembly steps are slower or concern a much bigger pool of precursor proteins. Thus, a different timing in the assembly of proteasomes could account for a different preponderance of the precursor intermediates and could explain that PAC3 has been primarily identified as an α -ring component in mammals, although we cannot exclude that Poc3/4 and PAC3/4 have slightly different functions in yeast and mammals. Meanwhile, it is worth mentioning that Poc3/4 interact with a smaller fraction of pro- β -subunits than does Poc1/2 (our unpublished results), which is consistent with a transient association between β -containing intermediates and Poc3/4.

Is the relative importance of chaperones the same in yeast and in mammals?

We have established that the physiological importance of 20S proteasome-specialized chaperones in yeast is as follows: Ump1>Poc3/4>>Poc1/2. Estimating the relative importance of different proteins in mammals using RNA interference is difficult, especially when their half-lives are as different as they are for PAC3 and PAC1/2 (Hirano et al., 2006; Hirano et al., 2005). However, it is tempting to speculate about the relative importance of chaperones in mammals. Four chaperones of the 20S proteasome have been described to date in human cells: hUMP1 (also called POMP), PAC1, PAC2 and PAC3 (Burri et al., 2000; Griffin et al., 2000; Hirano et al., 2006; Hirano et al., 2005; Witt et al., 2000). As in yeast, hUmp1 is the leader chaperone for the 20S proteasome assembly in human cells. hUmp1 function appears to be essential since a

strong deleterious effect is observed on cell viability when it is knocked down using RNA interference ((Heink et al., 2005) and our unpublished data). Based on the results obtained in yeast with Poc3/4, PAC3 and PAC4 should play a major role in the 20S proteasome assembly. Knockdown of *PAC3* or *PAC4* indeed severely impairs cell growth whereas no such effects were observed concerning *PAC1* and *PAC2*, even though *PAC1* and *PAC2* proteins are less stable than *PAC3* (Hirano et al, 2005; our unpublished results). This suggests that the relative physiological importance of 20S proteasome chaperones may be conserved from yeast to mammals.

Supplemental Experimental Procedures

Yeast Genetic Methods

Standard yeast genetic techniques and media were used (Sherman, 1991). Yeast strains used in this study are listed in Table S1. To determine growth in various conditions, yeast strains were grown to OD₆₀₀ = 0.1-0.5 before being plated at 10-fold serial dilutions on YPD medium with or without drugs. To minimize contextual variations, these experiments were carried out in three genetic backgrounds. All drugs were purchased from SIGMA-Aldrich. Doxycyclin was used at 5µg/mL in ethanol.

Screening method for isolation of RAD53-DL suppressors.

The 4,672 yeast deletion mutants generated by an international deletion consortium were assembled into 43 pools of about 110 strains in Dr Alain Jacquier's laboratory (Institut Pasteur, Paris). BLT15 strain contains TetO-RAD53-GFP and MFA2pr-NAT (Pα-NAT) integrated at TRP1 locus (see table S1). TetO-RAD53-GFP was integrated from pCM183-TetO-RAD53-GFP (Marsolier et al., 2000) and Pα-NAT from pGID3 (a generous gift from A. Jacquier). BLT15 strain was first transformed with pGID1 plasmid carrying a hygromycin resistance marker. For the mating reaction, a fresh culture of BLT15/pGID1 was mixed with the 43 pools of deletion strains on GNA presporulation medium (5% D-glucose, 3% bacto-peptone, 1% yeast extract) and incubated for 5 hours at 30°C. The resulting diploids were selected on GNA containing G418 (200µg/mL; SIGMA) and hygromycin (300µg/mL; INVITROGEN) and transferred into sporulation medium (1% potassium acetate, 0.005% Zinc acetate, supplemented with 5µg/mL doxycyclin) for five days at 25°C and further three days at 30°C. Cells were then spreaded in the absence of doxycyclin onto plates containing G418 (200µg/mL) and clonNAT (100µg/mL; Werner BioAgents) to select *RAD53-DL* haploid supressor strains.

Genomic DNA from suppressor strains was amplified by PCR using primers U1

(5'GATGTCCACGAGGTCTCT3') and KANMX-B (5'CTGCAGCGAGGAGCCGTAAT3'). The resulting PCR product was sequenced using KANMX-B primer to obtain the 20bp 'molecular bar-code' TAG sequence which is specific for each deletion. For more details, see http://www-sequence.stanford.edu/group/yeast_deletion_project.

Cell culture

HEK293T cell lines were cultured and transfected using the CaCl₂ method as previously described in (Chantalat et al., 2003). For immunoprecipitation experiments, cells were harvested 48h post-transfection. Stealth siRNA, purchased from INVITROGEN, are listed in Table S2.

DNA manipulation

The methods for DNA engineering were essentially those described in (Sambrook et al., 1989). Full-length human and mouse cDNAs were obtained as I.M.A.G.E clones from Geneservice and verified by sequencing. pHP9 and pHP11 correspond to mPAC3 and mPAC4, respectively, introduced into pcDNA3-myc3 to create an N-terminal 3xcMyc fusions under the pCMV promoter. pHP12 and pHP13 correspond to mPAC4 and mPAC3, respectively, introduced into p3XFLAG-CMV-7 vector (SIGMA-Aldrich).

Antibodies and Immunoblotting

Western blot analysis was performed as previously described (Peyroche et al., 1996). The primary antibodies used were the following: 16B12 anti-HA (Babco), 9E10 anti-Myc (Santa Cruz), anti-FLAG monoclonal antibody (Sigma), anti-pentaHis antibody (Qiagen), anti-Stag antibody (Novagen), anti- α subunits MCP231 (Biomol), anti- α 6 subunits MCP20 (Biomol), anti-“core” subunits (PW 9355; Biomol), anti-GAPDH (Abcam). A polyclonal antiserum was produced against Poc3 using the (His)₆Poc3 recombinant protein for immunization of rabbits. HRP-conjugated anti-rabbit or anti-mouse (Promega) were used as secondary antibodies. Detection was performed with ECL chemiluminescent reagents (Amersham Pharmacia).

Indirect immunofluorescence method

Immunofluorescence analyses were carried out as previously described (Peyroche et al., 2001) except that fixation was for 25 min at room temperature. Rabbit anti-Myc polyclonal A14 antibody (Santa Cruz, 1/100 dilution) was used as primary antibody. Alexa Fluor 594 anti-rabbit IgG (Molecular Probes, 1/100 dilution) was used as secondary antibody. DNA was stained with 0,5 μ g/mL 4'-6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) from Sigma.

Supplemental References

- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25, 3389-3402.
- Becker, E., Meyer, V., Madaoui, H., and Guerois, R. (2006). Detection of a tandem BRCT in Nbs1 and Xrs2 with functional implications in the DNA damage response. *Bioinformatics* 22, 1289-1292.
- Burri, L., Hockendorff, J., Boehm, U., Klamp, T., Dohmen, R. J., and Levy, F. (2000). Identification and characterization of a mammalian protein interacting with 20S proteasome precursors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 10348-10353.
- Chantalat, S., Courbeyrette, R., Senic-Matuglia, F., Jackson, C. L., Goud, B., and Peyroche, A. (2003). A novel Golgi membrane protein is a partner of the ARF exchange factors Gea1p and Gea2p. *Mol Biol Cell* 14, 2357-2371.
- Funakoshi, M., Li, X., Velichutina, I., Hochstrasser, M., and Kobayashi, H. (2004). Sem1, the yeast ortholog of a human BRCA2-binding protein, is a component of the proteasome regulatory particle that enhances proteasome stability. *J Cell Sci* 117, 6447-6454.
- Griffin, T. A., Slack, J. P., McCluskey, T. S., Monaco, J. J., and Colbert, R. A. (2000). Identification of proteasemblin, a mammalian homologue of the yeast protein, Ump1p, that is required for normal proteasome assembly. *Mol Cell Biol Res Commun* 3, 212-217.
- Heink, S., Ludwig, D., Kloetzel, P. M., and Kruger, E. (2005). IFN-gamma-induced immune adaptation of the proteasome system is an accelerated and transient response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 9241-9246.
- Hirano, Y., Hayashi, H., Iemura, S., Hendil, K. B., Niwa, S., Kishimoto, T., Kasahara, M., Natsume, T., Tanaka, K., and Murata, S. (2006). Cooperation of multiple chaperones required for the assembly of mammalian 20S proteasomes. *Mol Cell* 24, 977-984.
- Hirano, Y., Hendil, K. B., Yashiroda, H., Iemura, S., Nagane, R., Hioki, Y., Natsume, T., Tanaka, K., and Murata, S. (2005). A heterodimeric complex that promotes the assembly of mammalian 20S proteasomes. *Nature* 437, 1381-1385.
- Jones, D. T. (1999). Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J Mol Biol* 292, 195-202.
- Krogan, N. J., Cagney, G., Yu, H., Zhong, G., Guo, X., Ignatchenko, A., Li, J., Pu, S., Datta, N., Tikuisis, A. P., *et al.* (2006). Global landscape of protein complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 440, 637-643.
- Krogan, N. J., Lam, M. H., Fillingham, J., Keogh, M. C., Gebbia, M., Li, J., Datta, N., Cagney, G., Buratowski, S., Emili, A., and Greenblatt, J. F. (2004). Proteasome involvement in the repair of DNA double-strand breaks. *Mol Cell* 16, 1027-1034.
- Lassmann, T., and Sonnhammer, E. L. (2005). Kalign--an accurate and fast multiple sequence alignment algorithm. *BMC Bioinformatics* 6, 298.
- Li, X., Kusmierczyk, A. R., Wong, P., Emili, A., and Hochstrasser, M. (2007). beta-Subunit appendages promote 20S proteasome assembly by overcoming an Ump1-dependent checkpoint. *Embo J* 26, 2339-2349.
- London, M. K., Keck, B. I., Ramos, P. C., and Dohmen, R. J. (2004). Regulatory mechanisms controlling biogenesis of ubiquitin and the proteasome. *FEBS Lett* 567, 259-264.

- Marsolier, M. C., Roussel, P., Leroy, C., and Mann, C. (2000). Involvement of the PP2C-like phosphatase Ptc2p in the DNA checkpoint pathways of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 154, 1523-1532.
- Mieczkowski, P., Dajewski, W., Podlaska, A., Skoneczna, A., Ciesla, Z., and Sledziowska-Gojska, E. (2000). Expression of UMP1 is inducible by DNA damage and required for resistance of *S. cerevisiae* cells to UV light. *Curr Genet* 38, 53-59.
- Palmer, E. A., Kruse, K. B., Fewell, S. W., Buchanan, S. M., Brodsky, J. L., and McCracken, A. A. (2003). Differential requirements of novel A1PiZ degradation deficient (ADD) genes in ER-associated protein degradation. *J Cell Sci* 116, 2361-2373.
- Peyroche, A., Courbeyrette, R., Rambourg, A., and Jackson, C. L. (2001). The ARF exchange factors Gea1p and Gea2p regulate Golgi structure and function in yeast. *J Cell Sci* 114, 2241-2253.
- Peyroche, A., Paris, S., and Jackson, C. L. (1996). Nucleotide exchange on ARF mediated by yeast Gea1 protein. *Nature* 384, 479-481.
- Ramos, P. C., Hockendorff, J., Johnson, E. S., Varshavsky, A., and Dohmen, R. J. (1998). Ump1p is required for proper maturation of the 20S proteasome and becomes its substrate upon completion of the assembly. *Cell* 92, 489-499.
- Sambrook, J., Fritsch, E., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2nd ed. edn (Cold Spring Harbor, NY).
- Schaffer, A. A., Aravind, L., Madden, T. L., Shavirin, S., Spouge, J. L., Wolf, Y. I., Koonin, E. V., and Altschul, S. F. (2001). Improving the accuracy of PSI-BLAST protein database searches with composition-based statistics and other refinements. *Nucleic Acids Res* 29, 2994-3005.
- Sherman, F. (1991). Getting started with yeast. *Methods Enzymol* 194, 3-21.
- Soding, J. (2005). Protein homology detection by HMM-HMM comparison. *Bioinformatics* 21, 951-960.
- Witt, E., Zantopf, D., Schmidt, M., Kraft, R., Kloetzel, P. M., and Kruger, E. (2000). Characterisation of the newly identified human Ump1 homologue POMP and analysis of LMP7(beta 5i) incorporation into 20 S proteasomes. *J Mol Biol* 301, 1-9.

2.2 Poc3-Poc4 et PAC3-PAC4 : données récentes

L'identification de PAC3 chez les mammifères (Hirano et al, 2006) et des homologues de PAC1 et PAC2 chez la levure (Li et al, 2007) a immédiatement précédé la soumission de nos résultats. Depuis, 3 articles ont également rapporté l'existence d'une paire Poc3-Poc4 de protéines chaperonnes participant à l'assemblage du protéasome 20S et confirmé nos résultats (Hoyt et al, 2008; Kusmierczyk et al, 2008; Yashiroda et al, 2008). Les études de Yashiroda *et al.* et de Kusmierczyk *et al.* sont particulièrement intéressantes, malgré leur inélégance d'avoir renommé Poc3-Poc4 respectivement en Dmp2-Dmp1 (Degradation of misfolded protein) et Pba3-Pba4 (Proteasome biogenesis-associated), plus de 6 mois après la publication de notre article.

2.2.1 Formation de l'anneau α

Tout d'abord, Yashiroda *et al.* et Kusmierczyk *et al.* ont montré que l'hétérodimère Poc3-Poc4 s'associe aux complexes précurseurs du protéasome *via* une interaction directe avec la sous-unité $\alpha 5$: *in vitro*, parmi toutes les sous-unités α et β testées, Poc3-Poc4 interagit seulement avec $\alpha 5$ (Yashiroda et al, 2008), seule ou bien complexée à d'autres sous-unités α (Kusmierczyk et al, 2008). *In vivo*, les 7 sous-unités α ainsi que la sous-unité $\beta 2$ /Pup1 sous-forme précurseur co-immunoprécipitent avec Poc4, en accord avec nos résultats (Yashiroda et al, 2008). Un intermédiaire d'assemblage formé de l'anneau α et de $\beta 2$ associé aux chaperons Poc1-Poc2 et Poc3-Poc4 semble donc précéder le 13S, qui est lui composé des 7 sous-unités α , de $\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 4$, Ump1 et Poc1-Poc2 (Li et al, 2007).

Il est probable que Poc3-Poc4 soit associé à l'anneau α seul, voire même à un précurseur de l'anneau α . En effet, Yashiroda *et al.* et Kusmierczyk *et al.* ont montré que l'hétérodimère Poc3-Poc4 est nécessaire à la formation de l'anneau α . Son rôle exact diffère néanmoins selon les 2 études : assurer l'incorporation efficace de la sous-unité $\alpha 4$ au sein de l'anneau α pour les premiers (Yashiroda et al, 2008), empêcher $\alpha 4$ de s'incorporer à la place d' $\alpha 3$ pour les seconds (Kusmierczyk et al, 2008), cette substitution ayant déjà été observée en absence d' $\alpha 3$ (Velichutina et al, 2004). L'incorporation d' $\alpha 3$ et $\alpha 4$, qui est probablement la dernière étape de la formation de l'anneau α (au moins chez les mammifères, (Hirano et al, 2005)), apparaît à nouveau comme une phase critique de l'assemblage et semble donc sous le contrôle de Poc3-Poc4.

Nous avons observé une forte perturbation de la maturation du 20S en absence de Poc3-Poc4, visualisée dans les souches *poc3 Δ* ou *poc4 Δ* par l'accumulation des formes précurseurs des 3 sous-unités β catalytiques et la présence de propeptides au sein des protéasomes matures (Le Tallec et al, 2007). Ces effets peuvent être la conséquence d'une perturbation initiale de l'anneau α ou résulter d'un rôle « actif » de Poc3-Poc4 dans l'incorporation de certaines sous-unités β au sein de l'anneau α (au moins $\beta 2$), ou bien de la combinaison des 2. En effet, même si le complexe Poc3-Poc4 n'interagit pas directement avec les sous-unités β *in vitro*¹⁶, il pourrait par exemple masquer certains sites potentiels de liaison des sous-unités β sur l'anneau α , et assurer ainsi leur positionnement correct (Yashiroda et al, 2008). Cependant, dans une souche *poc4 Δ* , $\beta 2$ semble toujours associée à l'anneau α dépourvu d' $\alpha 4$ (Yashiroda

¹⁶ Pour mémoire, chez les mammifères, PAC3 interagit *in vitro* avec les sous-unités $\beta 3$ et $\beta 4$ (Hirano et al, 2006).

et al, 2008). La formation d'un anneau α correctement assemblé apparaît donc comme la fonction première de Poc3-Poc4.

2.2.2 Décrochage de Poc3-Poc4

Nous n'avons détecté qu'une très faible co-immunoprécipitation entre Ump1 et Poc3 ou Poc4 et proposé que l'hétérodimère Poc3-Poc4 soit associé aux complexes précurseurs du protéasome jusqu'à ce que Ump1 permette les étapes suivantes de maturation. Nous avons également observé une accumulation nucléaire de Poc3-Poc4 dans une souche *ump1 Δ* (contrairement à leur localisation nucléo-cytoplasmique dans une souche sauvage), ce qui indique que Ump1 est très probablement impliquée dans le relargage de Poc3-Poc4 du complexe précurseur (Le Tallec et al, 2007). Est-ce alors la liaison d'Ump1 elle-même qui entraîne la dissociation de Poc3-Poc4 ? Aucune interaction entre Poc3-Poc4 et Ump1 n'a été détectée par Yashiroda *et al.* *in vitro* ni *in vivo* (Yashiroda et al, 2008). Yashiroda *et al.* ont résolu la structure du complexe Poc3-Poc4- $\alpha 5$ (voir ci-dessous) et établi un modèle du complexe anneau α -Poc3-Poc4- $\beta 4$ qui suggère que la liaison de la sous-unité $\beta 4$ sur l'anneau α , en provoquant un encombrement stérique entre $\beta 4$ et Poc4, est à l'origine de la dissociation de Poc3-Poc4 (Yashiroda et al, 2008). Ces 2 modèles ne sont pas incompatibles : il est possible *in vivo* que l'association d'Ump1 (avant, simultanément ou après $\beta 4$) soit nécessaire au positionnement approprié de $\beta 4$ permettant le décrochage de Poc3-Poc4. La composition exacte du complexe précurseur auquel s'associe Ump1 reste par ailleurs à préciser.

2.2.3 Comparaison de Poc3-Poc4 avec PAC3

PAC3, homologue mammifère de Poc3, a été identifiée comme une protéine chaperonne du protéasome 20S nécessaire à l'assemblage de l'anneau α et décrochée des complexes précurseurs avant la formation des hémiprotéasomes (Hirano et al, 2006), définition à laquelle répond également Poc3. Alors qu'Hirano *et al.* ont proposé que PAC3 agisse sous la forme d'un homodimère, nous avons identifié PAC4 comme homologue mammifère de Poc4 et montré que PAC3 et PAC4 fonctionnent également sous la forme d'un hétérodimère (Le Tallec et al, 2007). Outre cette découverte, une différence entre Poc3 et PAC3 nous est apparue surprenante : alors que $\beta 2$ co-immunoprécipite avec Poc3, aucune interaction entre PAC3 et les sous-unités β n'est détectée chez les mammifères *in vivo*, bien que PAC3 se lie *in vitro* à $\beta 3$ et $\beta 4$ (Hirano et al, 2006). Le même laboratoire est à l'origine de l'étude sur Dmp1/Dmp2 ; de manière assez ironique, Yashiroda *et al.* ont retrouvé l'interaction de Poc3-Poc4 avec $\beta 2$ *in vivo*, mais ce complexe n'interagit avec aucune sous-unité β *in vitro* (Yashiroda et al, 2008). *Quid* de l'interaction avec les sous-unités β ? Comme nous l'avons souligné dans la discussion de l'article, il est possible qu'il existe certaines différences entre PAC3-PAC4 chez les mammifères et Poc3-Poc4 chez la levure. A bien y regarder, ces divergences pourraient ne pas affecter seulement les sous-unités β : PAC3 interagit bien *in vitro* avec une sous-unité α , mais il s'agit d' $\alpha 2$, et non pas d' $\alpha 5$ comme c'est le cas pour Poc3-Poc4 (Hirano et al, 2006; Kusmierczyk et al, 2008; Yashiroda et al, 2008). A moins que les différences observées ne soient pas liées à une divergence évolutive mais à l'utilisation au sein des ces expériences *in vitro* de PAC3 seule *versus* le complexe Poc3-Poc4. Il serait donc particulièrement intéressant de tester *in vitro* les interactions de Poc3/PAC3 et Poc4/PAC4 isolées avec les sous-unités α et β et de les comparer avec celles du complexe (il faut bien sûr pour cela que chaque protéine exprimée individuellement soit soluble, ce qui n'est

malheureusement pas le cas pour Poc3 ni Poc4 (Le Tallec et al, 2007)). *In vivo*, nous avons par exemple observé que les profils des sous-unités α co-immunoprécipitées avec PAC3 ou PAC4 lorsqu'elles sont surexprimées indépendamment sont identiques, mais qu'ils diffèrent du profil obtenu lorsque PAC3 et PAC4 sont surexprimées ensemble (données non présentées). Le Dr R. Guérois avait établi pour le laboratoire les modèles structuraux des protéines Poc3, Poc4, PAC3 et PAC4 et montré que leur architecture est très proche. Plus, la structure prédite des hétérodimères Poc3-Poc4 et PAC3-PAC4 est très similaire à celle des sous-unités α et β du 20S (données hélas non publiées, qui seront confirmées par Yashiroda *et al.* ; voir ci-dessous). Il est possible que Poc3/PAC3 ou Poc4/PAC4 puissent former des homodimères *in vitro* ou *in vivo*, avec une spécificité de liaison des α ou des β différente de celle de l'hétérodimère. Interactions artéfactuelles ou signification physiologique ? L'avenir le dira... peut-être.

2.2.4 Structure de l'hétérodimère Poc3-Poc4

La résolution de la structure de Poc3, Poc4 et PAC3 par Yashiroda *et al.* a révélé une similitude structurale très importante entre ces 3 protéines, et ce malgré des séquences primaires peu conservées (Yashiroda et al, 2008). Elles présentent une structure globulaire, qui consiste en 6 feuillets β associés à 2, 3 ou 4 hélices α (pour PAC3, Poc4 et Poc3, respectivement). La structure de l'hétérodimère Poc3-Poc4 est caractérisée par un repliement en « sandwich » des 2x6 feuillets β issus de Poc3 et Poc4, entouré de part et d'autre des hélices H1 et H3 de Poc4 et des hélices H2 et H4 de Poc3 (**figure RII 1**). Cette architecture ressemble étrangement à celle des sous-unités α et β du protéasome 20S, à l'exception près que leur « sandwich » de feuillets β est formé de 2x5 feuillets (voir **figure I 20**). La structure cristallographique du complexe Poc3-Poc4- $\alpha 5$ a néanmoins montré que la liaison de Poc3-Poc4 avec $\alpha 5$ diffère de l'interaction $\alpha 5$ - $\beta 5$ qui implique leur hélice H1. Ce mode de liaison unique explique probablement le rôle de chaperon du protéasome 20S du complexe Poc3-Poc4 (Yashiroda et al, 2008).

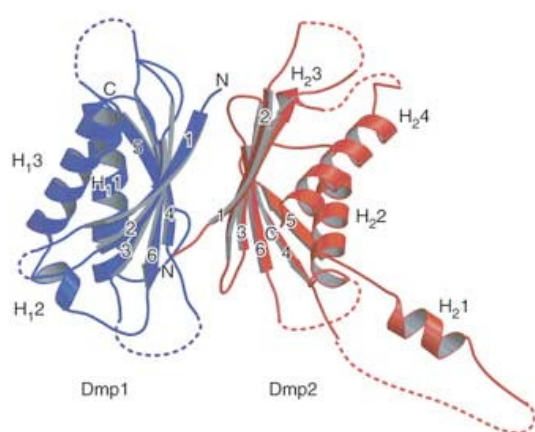


Figure RII 1. Structure du complexe Poc3-Poc4 (Dmp2-Dmp1). Extrait de (Yashiroda et al, 2008)

La structure de l'hétérodimère Poc3-Poc4 est caractérisée par un repliement en « sandwich » de 2x6 feuillets β entouré de part et d'autre des hélices H1 et H3 de Poc4 et des hélices H2 et H4 de Poc3. A titre de comparaison, les sous-unités α et β du protéasome 20S présentent un repliement commun caractérisé par 2x5 feuillets β entourés de part et d'autre par 2 hélices α , H1-H2 et H3-H4.

2.2.5 Conclusion

L'ensemble des études réalisées sur Poc3-Poc4 (PAC3-PAC4) permet de compléter le modèle d'assemblage du protéasome 20S présenté dans l'introduction (**figure RII 2**). Un modèle de plus en plus précis, où le rôle de contrôle-qualité des interfaces α/α , α/β et β/β par les

protéines chaperonnes Poc1/2/3/4 et Ump1 est mis en lumière. L'assemblage du protéasome 19S demeure quant à lui toujours aussi mystérieux, et aucune protéine chaperonne n'est connue. Peut-être qu'Hsm3, le dernier membre du groupe fonctionnel « protéasome »...

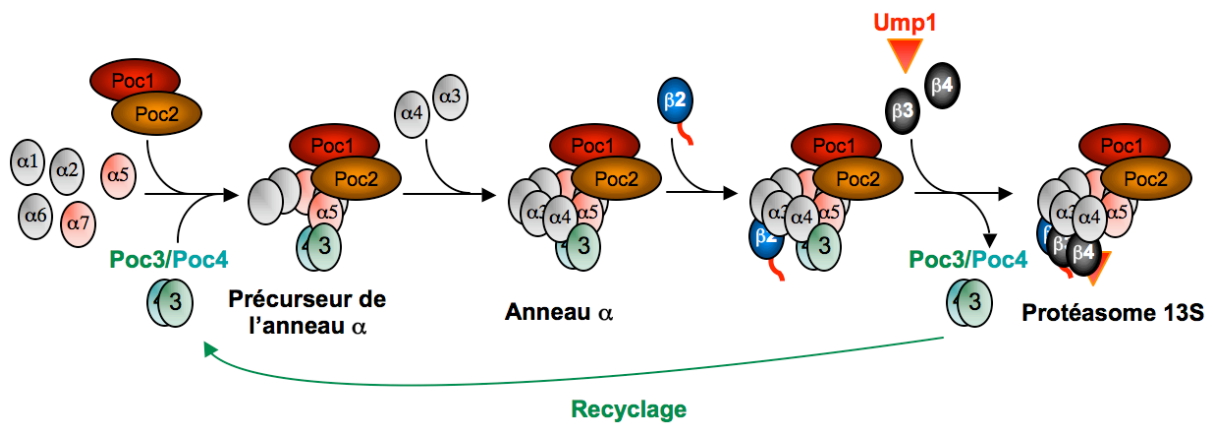


Figure RII 2. Rôle des protéines chaperonnes Poc3-Poc4 dans l'assemblage du protéasome 13S de *S. cerevisiae*

Deux hétérodimères de protéines chaperonnes, Poc1-Poc2 et Poc3-Poc4, participent à l'assemblage de l'anneau α . Poc1/Poc2 se lie aux sous-unités $\alpha 5$ et $\alpha 7$ libres et sert de plateforme d'assemblage pour l'anneau α . En parallèle, Poc3-Poc4 s'associe à $\alpha 5$ (du côté opposé à Poc1-Poc2 ?) et assiste l'incorporation des sous-unités $\alpha 3$ et $\alpha 4$. L'anneau α sert de plateforme d'assemblage à l'anneau β : la sous-unité catalytique $\beta 2$ (en bleu, propeptide en rouge) s'associe en premier, suivie de $\beta 3$, $\beta 4$ et de la protéine chaperonne Ump1, pour former le complexe précurseur 13S. La liaison de $\beta 4$ sur l'anneau α provoque un encombrement stérique entre $\beta 4$ et Poc4, ce qui décroche Poc3-Poc4, qui est alors recyclé. Poc1 et Poc2 restent constamment associées aux complexes précurseurs, empêchant l'homodimérisation d'anneaux α , et seront dégradées à la fin de l'assemblage du protéasome 20S.

Ce modèle peut très probablement être étendu en grande partie à l'assemblage du protéasome 20S des eucaryotes supérieurs (où PAC1-PAC2 et PAC3-PAC4 jouent respectivement le rôle de Poc1-Poc2 et Poc3-Poc4).

3. Hsm3/S5b contrôle l'assemblage du complexe régulateur 19S du protéasome

Article soumis à Molecular Cell.

Hsm3/S5b Controls the Assembly Pathway of the 19S Regulatory Particle of the Proteasome

Benoît Le Tallec,¹ Marie-Bénédicte Barrault,¹ Raphaël Guérois,² Thibault Carré¹ and Anne Peyroche^{1,#}

¹ CEA, iBiTecS, SBIGeM, Laboratoire du métabolisme de l'ADN et réponses aux génotoxiques, Gif-sur-Yvette, F-91191, France.

² CEA, iBiTecS, SB²SM, Laboratoire de Biologie Structurale et Radiobiologie, Gif-sur-Yvette, F-91191, France.

Correspondence : anne.peyroche@cea.fr

Phone: 33-1-69083460

Fax: 33-1-69084712

Running title: *Hsm3/S5b controls 19S base assembly via Rpt1*

SUMMARY

The 26S proteasome, the central enzyme of the ubiquitin-proteasome system, is comprised of the 20S catalytic core particle (CP) and the 19S regulatory particle (RP) itself composed of two multi-subunit subcomplexes, the base and the lid. 20S proteasome assembly is assisted by at least five chaperones. Integral subunits of the RP participate in its assembly but no external factors have been identified heretofore. Here, we characterize the yeast Hsm3 protein, which displays unique features regarding 19S assembly. Hsm3 associates with the 19S subcomplex *via* a carboxyterminal domain of the Rpt1 base subunit but is missing in the final 26S proteasome. Hsm3 is specifically required for the base subcomplex assembly and also modulates the association between the nascent 19S and the 20S proteasome. Finally, we identify the putative species-specific RP subunit S5b as a functional homolog of the Hsm3 chaperone in mammals. These findings shed new light on chaperone-assisted proteasome assembly in eucaryotes.

INTRODUCTION

The ubiquitin-proteasome system (UPS) is a major proteolytic system in the cytosol and nucleus of all eukaryotic cells (Voges et al., 1999). The 26S proteasome, the central enzyme of this pathway, regulates various cellular processes (cell cycle control, DNA repair, transcription, signal transduction and antigen presentation) by degrading proteins in most cases conjugated to ubiquitin (Glickman and Ciechanover, 2002; Wolf and Hilt, 2004; Goldberg, 2007).

The 26S proteasome comprises the catalytic core particle (CP or 20S particle) capped by one or two regulatory particles (RP or 19S caps or PA700 in mammals), forming RP/CP and RP₂/CP complexes respectively (Baumeister et al., 1998; Glickman et al., 1998b). CP proteasome has a barrel-shaped structure consisting of two inner heptameric rings of β -type subunits and two outer heptameric rings of α -type subunits (Groll et al., 1997). The proteolytic active sites, carried by three of the seven β subunits, are located in the central cavity of the proteasome barrel. These β subunits are synthesized as precursors, which upon assembly of the 20S particle undergo an autolytic processing liberating their catalytic threonine residue (Wolf and Hilt, 2004). The entry of substrates into the cavity of the 20S is restricted by a lattice-like structure formed by the N-termini of the α subunits (Groll et al., 2000). Activation of the 20S occurs upon opening this gate by proteasome activators among which the 19S RP (see (Saeki and Tanaka, 2007) for review). The 19S RP, which functions in substrates recognition, deubiquitination, unfolding and translocation through the channel of the 20S, provides the ATP- and ubiquitin-dependence on the CP (see (Goldberg, 2007) for review). The 19S RP can be subdivided into two subcomplexes, namely the base and the lid (Glickman et al., 1998a). Rpn10, which might serve as one of the ubiquitin receptors, is thought to lie between the base and the lid and to stabilize this association (Glickman et al., 1998a). Although the crystal structure of the yeast 20S core particle is known (Groll et al., 1997) that of the 19S regulatory particle is not yet available. The base contains six homologous ATPases subunits of the AAA family (referred to as Rpt1-6 in yeast) plus two non-ATPases, Rpn1 and Rpn2 (Voges et al., 1999 for review). By analogy to proteasome-like ATPases complexes in prokaryotes, the 19S ATPases are presumed to assemble into a six-membered ring that directly abuts the 20S particle ((Smith et al., 2006) for review). The ring is thought to be ordered as followed, Rpt1-3-5-4-6-2. Each of the Rpt proteins is highly conserved evolutionarily showing sequence identities around 70% between yeast and human homologs whereas Rpt are roughly 40% identical to each other within the same species (Glickman et al., 1998b). Moreover, they are not functionally redundant since each 19S ATPase appears to perform distinct functions in protein degradation (Rubin et al., 1998; Smith et al., 2007). Upon ATP binding, Rpt2, Rpt5 and Rpt3 trigger gate opening *via* a conserved carboxyterminal HbYX motif (Rubin et al., 1998; Kohler et al., 2001; Smith et al., 2007). Rpt5 might also directly recognize poly-ubiquitin signal (Lam et al., 2002).

Rpn1 and Rpn2, two non-ATPase subunits of the base, share about 20% of sequence identity. They contain Arm/HEAT repeats called PC (proteasome-cyclosome) repeats and are structurally related to each other forming α -helical solenoids but seem to assume distinct functions (Glickman et al., 1998b; Kajava, 2002). Recent data have suggested that Rpn2, but not Rpn1, can attach directly to the α -ring surface of the 20S CP (Rosenzweig et al., 2008). Unlike Rpn2, Rpn1 interacts with proteins containing ubiquitin-like domains, which bind ubiquitinated targets (Elsasser et al., 2002). Another protein, Rpn13 has been proposed as an

intrinsic subunit of 19S RP (Verma et al., 2000), which specifically binds ubiquitin (Husnjak et al., 2008). Rpn13 is associated with the RP *via* Rpn2 (Ito et al., 2001; Hamazaki et al., 2006). Finally, an additional 19S subunit, S5b, which interacts *in vitro* with a trimer containing Rpn1, Rpt2 and Rpt1, might be only present in mammals (Deveraux et al., 1995; Gorbea et al., 2000) and is even supposed to be tissue-specific.

The lid contains multiple non-ATPase subunits (Rpn3, Rpn5-9, Rpn11-12, Rpn15/Sem1), most of which are essential for viability in yeast. Six of them harbor a PCI (proteasome, CSN, eIF3) motif consisting in a C-terminal 'winged helix' domain preceded by a helical repeat region involved in protein-protein interactions (Scheel and Hofmann, 2005). Precise roles for lid subunits are still elusive except for Rpn11, which is a metalloprotease containing a MPN⁺/JAMM motif bearing a deubiquitination activity (Verma et al., 2002; Yao and Cohen, 2002).

19S RP stability is unaffected by the absence of ATP but ATP binding is necessary for assembly of 26S proteasome from 20S proteasome and 19S subcomplexes (DeMartino et al., 1994; Liu et al., 2006) (Hoffman et al., 1992). Some of the multiple proteasome-associated factors such as the yeast HEAT repeat protein Ecm29 and the PAAF1 protein in mammals may also influence the association between the 20S and the 19S (Leggett et al., 2002; Park et al., 2005; Lassot et al., 2007). In yeast, Blm10, another HEAT repeat protein, has been reported to attach directly to the α -ring surface of the 20S and could act as an alternative activator, similarly to the homologous mammalian PA200 activator (Schmidt et al., 2005; Iwanczyk et al., 2006).

Proteasome biogenesis is a highly orchestrated multistep event involving the biosynthesis of all subunits, their assembly and maturation processes. The different steps of assembly do not necessarily take place within the same intracellular compartment. Assembly probably starts in the cytoplasm but the final steps are thought to occur in the nucleus (Lehmann et al., 2002; Isono et al., 2007). Proper 20S subunit-subunit contacts are involved in optimal proteasome assembly and / or stability (Velichutina et al., 2004) (Ramos et al., 2004; Witt et al., 2006; Li et al., 2007; Marques et al., 2007). Moreover, prosequences of β subunits are required for efficient assembly in eukaryotes and some of them can be considered as intramolecular chaperones (Chen and Hochstrasser, 1996). 20S proteasome maturation in eukaryotes also involves additional proteasome-dedicated accessory proteins that assist assembling steps (Ramos et al., 1998; Hirano et al., 2005; Hirano et al., 2006; Le Tallec et al., 2007; Li et al., 2007; Hoyt et al., 2008; Kusmierczyk et al., 2008; Yashiroda et al., 2008). Mature 20S proteasomes are devoid of these assembly chaperones. Mutations in different base or lid subunits (Rpn2, Rpn5, Rpn6, Rpn9, Sem1) have been shown to induce defects in the assembly of the 19S subcomplexes (Takeuchi et al., 1999; Santamaria et al., 2003; Funakoshi et al., 2004; Isono et al., 2004; Isono et al., 2005; Isono et al., 2007). It can be assumed that there are proteins functioning as chaperones to control assembly of the lid or the base or both. However, no external factors have been identified for the assembly of the 19S RP to date.

In a previous study, we described a striking phenotype related to the DNA damage response that allowed us to isolate four 20S proteasome-specialized chaperones in budding yeast (Le Tallec et al., 2007). Here, we characterize another suppressor isolated in the same screen named *HSM3*. Our biochemical and genetic data indicate that Hsm3 is involved in 26S proteasome assembly. Hsm3 is strongly associated with the base subcomplex of the 19S RP and to a lesser extent with the complete 19S RP. By contrast, Hsm3 is missing in the 26S proteasome. Moreover, in the absence of Hsm3, strong defects are specifically observed in the

assembly of the base of the 19S whereas no defect is detected for 19S lid or 20S complexes. Hsm3 exerts its functions by directly binding a carboxy-terminal domain of the ATPase Rpt1. In addition to regulating the assembly of the base, Hsm3 also modulates the association between nascent RP and the 20S proteasome. Finally, we provide evidence that the mammalian putative species-specific 19S subunit S5b is conserved throughout evolution and is structurally and functionally related to the Hsm3 yeast chaperone.

RESULTS

HSM3 belongs to the proteasome epistatic group regarding the DNA damage response

Searching for new regulatory elements of DNA damage response in yeast, we have previously uncovered two pairs of chaperones (Poc1/2 and Poc3/4) for 20S proteasome assembly (Le Tallec et al., 2007). Deletion of the genes encoding these chaperones or other proteins implicated in 20S assembly pathway such as *PRE9* or *UMP1* suppresses the toxicity of a conditional dominant lethal allele of *RAD53*, hereafter referred to as *RAD53-DL* (Le Tallec et al., 2007). Among *RAD53-DL* suppressors, we also identified *SEM1*, which is a component of the lid subcomplex of the 19S regulatory particle of the proteasome (Funakoshi et al., 2004; Krogan et al., 2004; Sone et al., 2004) and *HSM3*, a poorly characterized gene (Fedorova et al., 2000; Merker et al., 2000) (Fig 1A). In the presence of *RAD53-DL* the double-mutant *sem1Δ hsm3Δ* strain did not grow better than the corresponding single mutants, indicating that these two genes form an epistatic group with respect to *RAD53-DL* suppression (Fig 1A). We have previously established that several proteasome mutants grew better than a wild-type strain in the presence of the carcinogenic alkylating agent 4-nitroquinoline 1-oxide (4NQO) ((Le Tallec et al., 2007) and Fig 1B). *sem1Δ* and *hsm3Δ* strains also exhibited this hyperresistance phenotype (Fig 1B), which is suppressed upon reintroduction of the corresponding wild-type genes (Fig 6D and data not shown). The level of hyperresistance observed in *sem1Δ* and *hsm3Δ* cells was comparable to the level observed in *poc1Δ* or *poc2Δ* cells (Fig 1B and data not shown). Moreover, there was no additive resistance to 4NQO when *hsm3Δ* mutation was combined with *poc1Δ* (Fig 1C), indicating that *HSM3* belongs to the proteasome epistatic group for this phenotype. Since the lid mutant *sem1Δ* displayed a hyperresistance to 4NQO, this phenotype seems not to be restricted to 20S proteasome mutants or to chaperones of 20S assembly mutants but is rather shared by several mutants impaired in 26S proteasome functions. Altogether, our results indicate that *HSM3* and proteasome gene products participate in a common pathway in DNA damage response. We therefore investigated the role of Hsm3 in proteasome functions.

HSM3 is genetically linked to proteasome functions

hsm3Δ cells exhibited a strong growth defect at 37°C in several genetic backgrounds (Fig 1D and data not shown), as also observed for *sem1Δ* cells (Funakoshi et al., 2004; Sone et al., 2004) and Fig 1D) and to a less extent for *rpn10Δ* or *poc3Δ* cells ((Le Tallec et al., 2007); Fig 1D) . If proper proteasome function requires Hsm3 protein, deletion of *HSM3* should exacerbate the growth defect of some proteasome mutants. *RPN4* encodes a transcriptional regulator of proteasome genes, and its deletion leads to lethality when combined with some proteasome mutants (Xie and Varshavsky, 2001; Le Tallec et al., 2007). Indeed, *HSM3* deletion caused synthetic lethality with a deletion of *RPN4* (Fig 1E). This result is in agreement with a previous genome-wide study (Collins et al., 2007). *RPN10* codes for a non-essential 19S RP subunit, whose deletion impairs growth of some proteasome mutants (Pan et al., 2006). We observed that *hsm3Δ rpn10Δ* cells exhibited slower vegetative growth compared to single deletion mutants at 34°C (Fig 1F).

Hsm3 associates with the base subcomplex of the 19S regulatory particle of the proteasome

We next assayed for a physical interaction between Hsm3 and the proteasomal complexes, using epitope-tagged proteins expressed from their endogenous promoters at the natural chromosomal locus. Genome-wide interaction studies have suggested that Hsm3 might associate with proteasome subunits (Gavin et al., 2002; Ho et al., 2002). TAP (Tandem Affinity Purification) and Myc epitope-tagged Hsm3 strains displayed a wild-type phenotype in the presence of 4NQO and at high temperature indicating that these proteins are functional (Fig S1). Total lysates from these strains were prepared and subjected to either anti-Myc immunoprecipitation or IgG pull-down. Proteins present in the immunoprecipitates were then analyzed by Western blotting using specific antibodies. We noticed that in total lysates the steady state amount of TAP-tagged Hsm3 was sub-stoichiometric compared to the amounts of TAP-tagged RP or CP subunits (Fig 2B left panel and data not shown). It turned out that all five 19S ATPases subunits we tested, namely Rpt1, Rpt2, Rpt3, Rpt5, Rpt6 and the non-ATPase subunit Rpn2 efficiently co-immunoprecipitated with Hsm3-myc or Hsm3-TAP (Fig 2A, 2B and data not shown). Moreover, Rpn1-TAP protein also effectively retained Hsm3-myc protein (Fig 2C, left panel; Fig S3). On the other hand, whereas Rpn10-myc and Rpn1-TAP base subunits, or Rpn9-TAP lid subunit successfully immunoprecipitated core-subunits of the 20S proteasome consistently with their participation in the 26S proteasome, neither Hsm3-myc nor Hsm3-TAP were able to retain any subunit of the core particle (Fig 2A, 2B). As expected from this observation, neither β 5/Pre2 nor α 1/Sc11 TAP-tagged 20S subunits coimmunoprecipitated Hsm3-myc (Fig S3). Yet under these experimental conditions all the myc or TAP-tagged proteins co-immunoprecipitate with several Rpt AAA-ATPase subunits and the Rpn2 subunit of the base subcomplex of the RP (Fig 2A, 2B and data not shown). These results strongly suggest that Hsm3 interacts with the 19S RP of the proteasome but is excluded from the 26S proteasome formed upon the association of the 19S RP with the 20S CP. We investigated further the association between Hsm3 and the 19S RP of the proteasome. TAP-tagged Rpn1 and Rpn9 efficiently co-immunoprecipitate both with Rpt5 and Rpn2 base subunits and Sem1 lid subunit, consistent with their participation in the 19S complex. By contrast, TAP-tagged Hsm3 was able to efficiently immunoprecipitate Rpt5 and Rpn2 subunits but was almost unable to effectively retain Sem1 (Fig 2B). Similarly, TAP-tagged Hsm3 barely retained myc-tagged Rpn11 or Rpn12 (Fig S2 and data not shown). In agreement with this observation, whereas Hsm3-myc was efficiently pulled-down using Rpn1-TAP (Fig 2C lanes 1 to 4), the lid TAP-tagged subunits Rpn5, Rpn6, Rpn9 and Rpn12 hardly retained Hsm3 (Fig 2C, lanes 5 to 7 and Fig S3). It has previously been shown that when performing affinity-purification of the 19S regulatory particle, moderate salt concentration (300mM NaCl) leads to CP from RP dissociation whereas increasing salt concentration up to 1M NaCl dissociates the lid from the base (Leggett et al., 2002). We carried out such experiments with either Rpn1 (base) or Rpn6 (lid) TAP-tagged proteins and analyzed their association with 20S subunits (α/β subunits), a base subunit (Rpt5), a lid subunit (Rpn8) and Hsm3-myc by western blotting upon treatment with different salt concentrations. We first confirmed that 20S subunits were readily dissociated from the base and lid subunits in the presence of moderate salt concentrations (Fig. 2C compare lanes 1 and 2 or lanes 5 and 6). Increasing salt concentration then led to the dissociation between base and lid subunits (Fig. 2C compare lanes 3 and 4 or lanes 7 and 8). Not surprisingly, the association of Hsm3-myc with Rpn1 was independent of the presence of the 20S proteasome (Fig. 2C

compare lanes 1 and 2). At very high salt concentration (1M NaCl), the lid and the base subcomplexes were almost completely dissociated (Fig 2C, lanes 4 and 8) but Hsm3-myc was still tightly associated with Rpn1 (Fig 2C, lane 4). By contrast, Hsm3-myc interaction with Rpn6 could no longer be detected when the lid and the base subcomplexes were dissociated, suggesting that the weak interaction observed between the lid and Hsm3 is mediated by the base subcomplex (Fig 2C, lane 8). Finally, as for *bona fide* subunits, association within the 19S cap (Verma et al., 2000), the association between Hsm3 and RP subunits was not modulated by ATP (data not shown). Since Hsm3 associated differentially with base and lid subunits, we explored the interaction between Hsm3 and Rpn10, which is supposed to be present at the interface of the lid and the base complexes. Rpn10 has been primarily described as a component of the base of the RP (Glickman et al., 1998a) but has also been purified with the lid subcomplex (Saeki et al., 2000). TAP-tagged Hsm3 barely immunoprecipitated Rpn10 subunit in comparison to Rpn1-TAP or Rpn9-TAP proteins (Fig 2B). This weak interaction between Rpn10 and Hsm3 was reminiscent of what was observed between Hsm3 and lid subunits (Fig S4).

We then analyzed the distribution of Hsm3 in relation to proteasome subunits using gel filtration chromatography. Whole cell extracts prepared in the presence of ATP and MgCl₂ were size-fractionated on a Superose 6 gel filtration column and the resulting fractions were analyzed by immunoblotting (Fig 2D). Hsm3-TAP protein was detected in elution peaks corresponding to high molecular size species (between 200 and 600kDa) roughly co-migrating with 15S and pre-RP complexes (Fig 2D). Consistently with what was observed in immunoprecipitation experiments, Hsm3 was not significantly detected at positions of 26S proteasomes (fractions 3-7) in contrast to Rpt1 or Sem1 RP subunits. In addition, we undertook native gel electrophoresis experiments followed by western blot analysis to assess the potential different *in vivo* complexes containing Hsm3. Subjecting total cell extracts to nondenaturing gel analysis allows to resolve several proteasome-related species (Elsasser et al., 2005). Hsm3-TAP signal was very faint in comparison with Rpn1-TAP or Rpn9-TAP signal (Fig 2E), which is consistent with the low level of Hsm3 detected in total extracts after SDS-PAGE as already noticed. However, longer exposure allowed us to detect two distinct species containing Hsm3 (Fig 2E). The main one (complex I) corresponded to species containing Rpn1 and Rpt5 but not Rpn9 (Fig 2E and data not shown), which is likely to be a base-like complex. The minor one (complex II) co-migrated with the band we identified as a RP-like complex since it is co-revealed by anti-TAP-Rpn9 antibody and also with anti-Rpn1-TAP, Rpt1, Rpt2 and Rpt5 antibodies but not with anti-20S antibodies (Fig2E, 3B, 3C, and data not shown). Under the conditions we used, RP/CP and RP₂/CP appeared to co-migrate since 20S β 5 subunit, Rpn9-TAP lid subunit and Rpn1-TAP base subunit were detected altogether as a single band (Fig 2E). Moreover, this band displayed high hydrolytic activity after staining the gel in the presence of the LLVY-AMC fluorogenic substrate indicating the presence of active 26S species (data not shown). Importantly, we never detected an association between Hsm3-TAP and catalytically active species. These observations correlate well with the strong interaction between Hsm3 and base subunits, the weak association between Hsm3 and lid subunits and the absence of Hsm3 from the 26S proteasome observed in immunoprecipitation experiments.

Taken together these data indicate that Hsm3 is primarily associated with a base-like subcomplex of the regulatory particle of the proteasome and suggest that this association is

weakened once the base associates with the lid. Moreover, the association with the base subcomplex seems to occur in the absence of Rpn10 subunit.

Hsm3 participates in 26S proteasome assembly

As Hsm3 is not part of the final 26S proteasome but associates with the base of the RP, it could participate in the assembly of the proteasome. Thus we asked whether the absence of Hsm3 had any functional impact on maturation and activity of the 26S proteasome. Since the deletion of *HSM3* leads to growth impairment at 37  C (Fig 1D), we anticipated that proteasome defects in *hsm3  * cells would be exacerbated at high temperature possibly because these conditions correspond to an extra burden on proteasome activity. Most mutants affected in either the proteasome biogenesis or function are defective in the degradation of high-molecular weight ubiquitin (Ub) conjugates (London et al., 2004). *hsm3  * strains accumulated large amounts of poly-Ub at 37  C indicating that ubiquitin-proteasome dependent proteolysis is impaired in the absence of Hsm3 (Fig S5). We next investigated proteasome maturation defects when *HSM3* is deleted. Since deletion of *SEMI* induces severe growth defects at high temperature (Fig 1D) and impairment of assembly and/or stability of the lid (Funakoshi et al., 2004; Sone et al., 2004), we used *semi  * as a control. First, size-fractionated extracts from wild-type, *hsm3  * and *semi  * cells shifted to 37  C for several hours were analyzed by immunoblotting with anti-core subunits antibodies (Fig 3A, upper panel). In both mutants, a lesser amount of 20S core-subunits was detected in the heaviest fractions (1 to 6) corresponding to 26S proteasome species in wild-type background, suggesting that fewer 26S proteasomes are assembled in the mutant cells. At the same time, more a/b containing species accumulated in fractions 7 to 10 in the mutant cells compared to the wild type (Fig 3A, upper panel). A similar modest shift corresponding to an increased level of free CP relative to intact 26S proteasome has previously been observed in *semi  * cells (Funakoshi et al., 2004). Since we did not observe any accumulation of precursor forms of    subunits in the *hsm3  * mutant cells (data not shown), we hypothesize that the intermediates accumulated are 20S-like species. We next assayed the peptidase activity of the size-fractionated extracts using a specific fluorogenic substrate. A significant reduction of chymotrypsin-like activity in fractions 1-7 containing the 26S proteasomes was observed in extracts from either *hsm3  * or *semi  * cells compared to the wild type (Fig 3A, lower panel). In addition, proteasome species present in lysates of the different strains were analyzed by western blotting following native gel electrophoresis (Fig 3B). As stated above, CP/RP and CP/RP₂ roughly co-migrated (Fig 2E, 3B and data not shown). In addition to these complexes, a band with a higher electrophoretic mobility was revealed by both anti-base subunit antibodies (directed against Rpn1, Rpt1, Rpt2, Rpt5 and Rpn10) and anti-lid subunit antibody (against Sem1) but not by anti-core antibodies (Fig 3B lanes 1,3,5 and data not shown). Thus, we infer that this band corresponds to a RP complex. Strikingly, free RP complexes almost completely disappeared in *hsm3  * cells shifted to 37  C (Fig 3B, lanes 2,4,6), suggesting that in this context there is less free RP. This remarkable alteration was also observed in a *rpt1* thermosensitive strain (*cim5-1*) and in a *semi  * strain (Fig 3C), highlighting similarities between *hsm3  * cells and RP mutants. Even though it should be noticed that unlike Rpt1 and Sem1, Hsm3 is not part of the RP associated with the 20S proteasome. In addition, the deletion of *BLM10* partially suppressed the thermosensitivity of *hsm3  * cells at 37  C (Fig S6). One interpretation is that Blm10 association with the    ring is detrimental to *hsm3  * cells as Blm10 could compete with the few competent RP assembled in the absence of hsm3.

Hsm3 is specifically required for 19S base subcomplex assembly

Hsm3 tightly associates with the base of the regulatory particle but is absent from mature 26S complexes. This suggests that Hsm3 could participate in assembly of the base subcomplex. To test this hypothesis, we examined the composition of the different subcomplexes of the 26S proteasome in *hsm3  * cells shifted at 37  C for several hours in comparison with the isogenic wild-type strain. First, we investigated the perturbations within the base subcomplex by immunoprecipitation using Rpn1-TAP strain. As expected, we observed that in wild type cells, Rpn1-TAP efficiently retained all the Rpt subunits we tested along with Rpn2 subunit (Fig 4A,C). As we used experimental conditions that preserve the integrity of the 26S proteasome complex (ie low salt concentrations and presence of ATP), core subunits of the 20S proteasome were also recovered using Rpn1-TAP as a bait (Fig 4A,C). By contrast, in *hsm3  * cells, the association between Rpn1 and Rpn2, Rpt1, Rpt3, Rpt5 or Rpt6 was severely impaired whereas its association with Rpt2 seemed less affected (Fig 4A,C). Remarkably, the impairment of these associations was not sensitive to high salt concentrations indicating that assembly rather than stability is compromised in the absence of Hsm3 (Fig S7). We also examined the subunits associated with Rpn2-TAP protein in mutant and wild-type cells and we observed that in the absence of Hsm3, several base subunits (Rpt2, Rpt6, Rpt5 and Rpn10) were in a large part dissociated from Rpn2-myc whereas association with Rpt1 appeared less impaired (Fig 4B). Moreover, in the absence of Hsm3, Rpn1-TAP or Rpn2-myc could no longer efficiently immunoprecipitate the core subunits of 20S proteasome (Fig 4A,B,C). This observation is consistent with gel filtration analysis showing that there were less 26S proteasomes in *hsm3  * mutant cells.

As we observed that, similar to the absence of Sem1, the absence of Hsm3 led to a reduction of 26S proteasome and to a dramatic decrease in the level of free RP (Fig 3), we compared the specific defects induced by the two mutants within each subcomplex of the 26S proteasome using our co-immunoprecipitation approach. In contrast to what was observed in *hsm3  * cells (Fig 4A,B), we did not detect any significant impairment in the association between Rpn1 and other base subunits in *sem1  * cells (Fig 4C). However, the association between Rpn1 and the core subunits of the 20S is less efficient in *sem1  * cells as already reported (Fig 4B and (Funakoshi et al., 2004)). This is consistent with the decrease of the level of the 26S proteasome observed in these cells (Fig 3A). Hence, intra-base defects appear to be specific for *hsm3  * cells. We next analyzed the association between 20S proteasome and the base of the 19S RP in mutant cells using myc-tagged Pre9/  3 (Fig 4D). As shown in Fig 4D, the association within 20S proteasome was not notably perturbed in the absence of Hsm3 whereas the association between 20S proteasome and base subunits was severely reduced. A modest decrease in 20S-base association was also observed in *sem1  * cells (Fig 4D). The absence of Sem1 affected the interactions within the lid subcomplex (Fig 4E, S8A) as illustrated by a poor co-immunoprecipitation between Rpn12 and Rpn8 (Fig 4E). Meanwhile we could not detect any defect concerning these intra-lid interactions in *hsm3  * cells (Fig 4E, S8A,B). In summary, the absence of Hsm3 specifically induces severe defects in the structural integrity of the base of the regulatory particle but not of the lid whereas the absence of Sem1 affects the association between lid subunits without major perturbations within the base suggesting that the two subcomplexes assemble mostly in an independent manner. Using a lid *rpn5* mutant and a base *rpn2* mutant, others observed similar independency about the assembly/stability of the two subcomplexes (Isono et al., 2007). The absence of Hsm3

severely impairs the association between the base and the 20S proteasome. The simplest explanation for the latter observation is that in the absence of Hsm3 the architecture of the base collapses.

Hsm3 controls RP-CP association

Hsm3 containing complexes do not interact with 20S proteasome. We therefore asked if Hsm3 had a role in regulating 19S-20S association. We observed that the overexpression of Hsm3 did not perturb the association of subunits within the base (Fig 5A, compare lanes 4 and 5, right panel) nor the association between the lid and the base (Fig 5A, compare lanes 7 and 8, right panel), but induced a severe decrease in the association between the 19S and the 20S, as judged by the poor co-immunoprecipitation between RPN1-TAP or RPN9-TAP with 20S subunits (Fig 5A, compare lanes 4 and 5 and 7 and 8, right panel). We then examined the association of Hsm3-myc with the RP subunits when Hsm3 was overexpressed. First, we observed that the ratio of Hsm3-myc associated with whole RP in native gel experiments was several fold increased upon Hsm3 overexpression (data not shown). Consistently, the amount of Hsm3-myc pulled-down by Rpn9-TAP lid subunit increased when Hsm3-myc was overexpressed whereas the pull-down of 20S CP was less efficient as indicated above (Fig 5B). No such effect was observed when overexpressing the Rpt1 base subunit (Fig 5A). These results indicate that the overexpression of Hsm3 is accompanied by a sustained interaction with the whole RP and specifically perturbs the association between the regulatory particle and the 20S core proteasome, suggesting that when present on the base or nascent RP, Hsm3 may regulate the association between RP and 20S proteasome.

Moreover, given the strong interaction of Hsm3 with the base compared to the weak interaction with the whole 19S complex, it is possible that 19S assembly completion, *ie* lid association with the base, might be responsible for Hsm3 being released from the base. This would explain why several lid assembly mutants, in which Hsm3 may be improperly released from the RP, exhibit a reduced interaction between the base and the CP (Isono et al., 2007). We thus reasoned that growth impairment of such lid mutants should be alleviated in the absence of Hsm3. Indeed, we observed striking genetic interactions between *HSM3* mutants and *SEM1* mutants. Growth of *sem1Δ* cells was severely impaired at 34°C whereas no growth defect was observed at this temperature for *hsm3Δ* cells (Fig 5C). However, *sem1Δ* cells could grow at 34°C when *HSM3* is deleted (Fig 5C). This indicates that the presence of Hsm3 is detrimental to *sem1Δ* cells.

Hsm3 interacts with a C-terminal domain of Rpt1

To further refine the association of Hsm3 and the base of the 19S RP, we probed which part of the base binds Hsm3. We thus carried out an interactor hunt using a fragment library screening approach in the two-hybrid system. We created a fusion between Gal4 DNA binding domain (Gal4DBD) and Hsm3. The functionality of the fusion protein was verified by introducing the plasmid bearing Gal4DBD-Hsm3 in the *hsm3Δ* strain. As the presence of the plasmid was sufficient to restore the growth of *hsm3Δ* cells at 37°C, we concluded that the fusion protein could assume the functions of Hsm3 (Fig S9). Using this functional Gal4DBD-Hsm3 as a bait, we mainly isolated Rpt1 containing fragments. More precisely, it turned out that a fragment corresponding to the 90 last amino acids of Rpt1 was sufficient to mediate an interaction with Hsm3 in the two-hybrid system (Fig 6A). This interaction was also observed when Hsm3 was fused to Gal4 activating domain (Gal4-AD) and the fragment of Rpt1 fused

to Gal4-DBD (Fig S10). We then used Gal4-DBD-Rpt1_[377-467] as a bait in a two-hybrid screening for searching interactors of this C-terminal domain of Rpt1. The vast majority of the preys we isolated corresponded to different fragments of Hsm3 (data not shown). A fusion protein lacking the 115 first amino acids of Hsm3 was able to mediate the interaction with Rpt1_[377-467] (Fig 6B and data not shown), suggesting that a minimal domain of interaction with Rpt1 is comprised within the three-quarter carboxy-terminal part of Hsm3. As we did not identify other proteasome subunits in the screen using this C-terminal part of Rpt1, it is unlikely that the interaction between Hsm3 and Rpt1 is mediated by other proteasome subunits. To confirm that this interaction is direct, we investigated an *in vitro* interaction using bacterially co-expressed full length Hsm3 protein fused to His₆-GST (rHsm3) and the carboxy-terminal fragment of Rpt1 fused to MBP (Maltose Binding Protein) (rRpt1_[377-467]). First, we observed that co-expression resulted in a dramatic increase in the levels of soluble rHsm3 and rRpt1_[377-467] (Fig 6C left panel). Such an increase in solubility is strongly indicative of a stable association between the two proteins. Indeed, recombinant rRpt1_[377-467] protein co-purified with rHsm3 protein on Nickel resin (data not shown) and reciprocally, rHsm3 protein co-eluted with rRpt1_[377-467] protein immobilized on amylose beads (Fig 6C, right panel). Moreover, both recombinant proteins appear to associate with a 1:1 ratio when purified successively on amylose resin and Ni⁺⁺-beads. Analysis of purified rHsm3 / rRpt1_[377-467] by gel filtration indicated that they were part of a ≈150kDa complex corresponding to a heterodimeric complex (data not shown). Taking together these results indicate that Rpt1 may be the primary Hsm3 binding subunit of the base and strongly support that Hsm3 interacts with the base of the RP *via* the carboxyterminal part of Rpt1.

Rpt1 and Hsm3 are important partners in vivo

We showed that Hsm3 and Rpt1 directly interact with each other. To establish whether this interaction is important for Hsm3 and Rpt1 functions *in vivo*, we tested the effects of overexpressing each of these proteins in a context of deficiency for the other one. We observed that overexpression of Rpt1 could compensate for the absence of Hsm3 as judged by the restoration of normal growth at 37°C and of wild-type sensitivity towards 4NQO (Fig 6D, middle panel). To evaluate the effect of Hsm3 overexpression on Rpt1-related functions *in vivo*, we used a thermosensitive allele of *RPT1* referred as *cim5-1* (Ghislain et al., 1993). We observed that this allele confers not only a thermosensitive growth defect as previously described but also a hyperresistance to 4NQO (Fig 6D, lower panel). This observation pointed out once again that hyperresistance towards 4NQO is a broad hallmark of the impairment of 26S proteasome function. The overexpression of Hsm3 could partially compensate for the growth defects observed at semi-restrictive temperature (34°C) in the *cim5-1(rpt1ts)* mutant even though no significant effect was seen at 37°C or in presence of 4NQO (Fig 6D, lower panel). These observations are rather specific since the overexpression of Rpt6 or Sem1 did not rescue the thermosensitivity of *hsm3Δ* cells nor the overexpression of Hsm3 improved *cim3-1(rpt6ts)* or *sem1Δ* growth at restrictive temperatures (data not shown). These results strongly suggest that the main function of Hsm3 is closely linked to Rpt1.

Hsm3 shows structural and functional homologies with the human S5b Arm/HEAT repeat protein

The RP subunits, and especially the AAA⁺-ATPases subunits are strongly conserved throughout evolution (Glickman et al., 1998a). We showed that Hsm3 and Rpt1 interact with

each other and that Hsm3 is a potent assembly factor of the base of the 19S RP. In such a scenario, it is likely that homologs (at least functional homologs) exist in mammals. PSI-Blast based searches on the nr sequence database did not identify any specific homologs for Hsm3 in higher eukaryotes. We thus applied an in-depth sequence search procedure similar to that described in (Becker et al., 2006; Le Tallec et al., 2007). From the multiple sequence alignment of Hsm3 homologs in fungi, profile-profile comparisons unambiguously established the presence of Arm/HEAT repeats all along Hsm3 sequence. Given the large occurrence of this domain superfamily within genomes, detection of a specific homolog in higher eukaryotes was quite unlikely. Hsm3 profile was compared with profiles from the CDD database (Marchler-Bauer et al., 2007) using the HHSearch algorithm [(Soding, 2005)] and detected weak analogies with several Arm/HEAT repeat containing protein families including the KOG4413 profile associated to the protein S5b encoded by the gene referred to as *PSMD5* (proba=31.6 %, E-value=20) (Deveraux et al., 1995). Both Hsm3 and S5b multiple sequence alignments were refined independently, taking into account secondary structure predictions and the structural constraints inherent to Arm/HEAT repeats structures. The resulting alignments yielded a much higher HHSearch confidence score (proba=99.7, E-value=3e-19) and both sets of homologs could be consistently aligned over their whole sequences although the sequence identity between *S. cerevisiae* Hsm3 and human S5b does not exceed 15 % (Fig. S11). The resulting global alignment contains 43 sequences comprising all major taxa including a divergent homolog from *S. pombe* (Fig. S11). Strikingly, S5b has been identified as a component of proteasome prepared from red blood cells and found in association with Rpt1-Rpt2 or Rpt1-Rpt2-Rpn1 when co-translated in reticulocyte lysates along with these base subunits (Gorbea et al., 2000). However, specific homologs of S5b protein have not been clearly identified in other species. Moreover, this protein was not recovered by others in mammalian 26S or 19S preparations. Thus it has been suggested that S5b could be a species-specific or even a tissue-specific subunit of 19S proteasome. Our study offers the alternative explanation that S5b and Hsm3 are remote homologs and their functional similarities even suggest that they are orthologous genes.

We observed that an epitope-tagged S5b expressed from a pcDNA3 derivative plasmid in human HEK293T cells efficiently coimmunoprecipitated with several endogenous human RP subunits namely Rpt1, Rpt2, Rpn2 and Rpn7 but not with 20S subunits (Fig 7B). Reciprocally, when $\alpha 6$ subunit was immunoprecipitated, several Rpt subunits are co-immunoprecipitated whereas S5b-myc was not (data not shown). This is consistent with the idea that S5b is not part of 26S proteasome but rather interacts specifically with the regulatory particle. By testing *in vitro* interactions between chimeric proteins, it has been suggested that S5b could interact with the N terminal part of Rpt1 (Gorbea et al., 2000). However, our assumption concerning the homology between Hsm3 and S5b predicts that the two proteins should interact with the same part of Rpt1 protein. We therefore assayed S5b-Rpt1 interaction using yeast two-hybrid system. The experiment showed that S5b interacts with the C-terminal domain of yeast Rpt1 protein but also with the equivalent C-terminal fragment of human Rpt1 (hRpt1_[344-STOP]) (Fig 7C). This observation is consistent with the inferred functional conservation of Hsm3 and S5b.

From the global multiple sequence alignment (Fig. S11), a structural model for S5b was built by homology using the structure of the beta-catenin as a template (PDB : 2z6h). S5b structure is predicted to be made of 22 α -helices arranged into a Arm/HEAT repeats manner (Fig 7A). The conservation grade was calculated from the S5b/Hsm3 alignment and mapped at the

surface of the S5b model (Fig 7A). A central patch spanning $\alpha 9$ and $\alpha 11$ helices appears specifically conserved with two invariant residues, R184 and D220 in S5b found in close proximity (corresponding to R195 and D230 in Hsm3, respectively). Another region close to the C-terminal end (helix $\alpha 19$) also exhibits some conservation although this region is not present in the homologs of Hsm3 from 5 related fungi, namely *M. grisea*, *G. zeae*, *N. crassa*, *B. fuckeliana* and *S. sclerotiorum*, that are predicted to be made of only the first 14 α -helices. As the interaction between S5b/Hsm3 and Rpt1 is conserved in higher eukaryotes, it is likely to imply shared motifs in Hsm3/S5b proteins. We thus hypothesized that R195 (one of the invariant residue of Hsm3) might be involved in the interaction with the C terminal domain of Rpt1 protein. To test this hypothesis, we mutagenized this residue from arginine to either alanine (R195A) or glutamate (R195E) in the yeast *HSM3* gene and tested the ability of mutated proteins to interact with yRpt1_[377-STOP] in the two hybrid system. In both cases, mutation of R195 in Hsm3 protein impaired the association with Rpt1 for each reporter gene (Fig 7D). We noticed that substitution of arginine for glutamate almost completely abolished the 2-hybrid interaction whereas arginine to alanine substitution displayed more modest effects (Fig 7D). Western blot analysis revealed that the different hybrid proteins were expressed to similar levels under these experimental conditions, suggesting that the decrease in 2-hybrid signal is rather due to a poorer interaction between the two partners than to an intrinsic destabilization of mutant proteins (Fig 7C, bottom panel). This result points to a critical role of this arginine residue in the interaction of Hsm3 with Rpt1.

DISCUSSION

Hsm3 is a chaperone of the 19S regulatory particle of the proteasome

Hsm3 harbors several general characteristics of proteasome-related proteins. First, its absence is correlated with hyperresistance towards 4NQO, accumulation of poly-Ub conjugates and synthetic growth defects when combined with *rpn4Δ* or *rpn10Δ* mutants. Second, Hsm3 is physically and tightly associated with the base subcomplex of the RP *via* its interaction with the carboxyterminal part of the Rpt1 ATPase. Moreover, Hsm3 displays unique features related to proteasome functions: it is required for the integrity of the base subcomplex of the 19S particle but is absent from the 26S proteasome. Hence, Hsm3 should be considered as a *bona-fide* 19S assembly chaperone.

Regulation of the assembly of the base by Hsm3

One of the most striking effects of the absence of Hsm3 is its impact on the organization of the base subcomplex of the RP. We showed that in the absence of Hsm3, Rpn1 interacts almost no longer with Rpn2 and Rpt1, far less efficiently with Rpt3/5/6 whereas its interaction with Rpt2 is less impaired. On the other hand, the interaction of Rpn2 with Rpt2, 5, 6 is severely impaired whereas its interaction with Rpt1 seems less affected. Hence, it appears that in the absence of Hsm3, aberrant base subcomplexes could be formed. These results indicate that Hsm3 is required for a well-matched association between Rpn1, Rpn2 and the whole ATPase ring and thus for assembly of the base. Since overexpression of Rpt1 almost suppresses all the growth defects due to the invalidation of *HSM3*, it is likely that the action of Hsm3 is in great part linked with the role of Rpt1 in RP assembly.

Our study shows that Hsm3 is mainly associated with a base subcomplex devoid of Rpn10. It suggests that Rpn10 joins the RP complex later than Rpn1, Rpn2 and the ATPases. This is consistent with a previous observation that described the formation of a base lacking Rpn10 in a *rpn9Δ* lid mutant (Takeuchi et al., 1999). Hence, Rpn10 is biochemically related to the base but seems to correspond to a separate module for assembly.

Hsm3 is conserved from yeast to mammals

Since S5b was not identified in other species but was associated in a stoichiometric manner with several RP base subunits (Gorbea et al., 2000), it has been proposed that S5b is a species-specific RP subunit. S5b has even been supposed to be a tissue-specific subunit as it has not been found in all 26S or 19S proteasome preparations. Our study demonstrates that a unique homologous protein can be found in a large spectrum of eukaryotic organisms, showing that S5b function is not limited to mammals. The sequence identity between *S. cerevisiae* Hsm3 and human S5b is less than 15%. Such rather low levels of sequence identity have already been observed for 20S assembly chaperones for which functional and structural studies have demonstrated the pertinence of the sequence homology detected *in silico* (Le Tallec et al., 2007) (Yashiroda et al., 2008). In this study, we provide evidence that S5b shares functional features with Hsm3. Our data indicate that S5b preferentially interacts with the regulatory particle not associated with the 20S complex.

S5b has been shown to form a complex with Rpt1-Rpt2 dimer and also with Rpn1-Rpt1-Rpt2 trimer (Gorbea et al., 2000). Indirect data have suggested that S5b could interact with the N-terminal domain of Rpt1. However, we show that S5b can interact with the carboxyterminal

domain of Rpt1 (both yRpt1 and hRpt1), as Hsm3 does (see below). Interactions between the *C. elegans* and the *D. melanogaster* Hsm3 homologs and the Rpt1 subunit have been detected in high-throughput interaction studies (Walhout et al., 2002; Giot et al., 2003; Li et al., 2004), strengthening the functional significance of the proposed sequence homology.

Looking at the conservation grade, our structural model revealed that a central region of Hsm3/S5b appears to be less divergent than the other parts of the proteins. Within this region, we pinpointed a highly conserved arginine residue (corresponding to R195 in yeast Hsm3 protein) that is important for Rpt1 binding.

Hsm3 specifically interacts with the C-terminal domain of Rpt1

Binding of Hsm3 to the Rpt1 ATPase is likely to be exclusive to that particular ATPase and occurs *via* the extreme C terminus of the Rpt1 protein since expression of this fragment alone promotes interaction both in the 2-hybrid system and *in vitro*. The carboxyterminal domain of another 19S ATPase, Rpt3, was also found involved in an interaction with the human gankyrin and its yeast homolog Nas6, which have been proposed to act as bridging factors between proteasome and substrates (Dawson et al., 2002). Both interacting domains in Rpt1 and Rpt3 span the same region, consisting in a four α helices bundle in the Rpt3 complex structure. Nas6 forms an elongated shape structure consisting in seven ankyrin repeats. Rpt3 binds into the concave region of Nas6. Almost all the seven ankyrin repeats of Gankyrin/Nas6 contact Rpt3 (Nakamura et al., 2007a; Nakamura et al., 2007b). Our study shows that the three-quarter C-terminal part of Hsm3 is sufficient to support the interaction with Rpt1. Based on the structural models available, it is plausible that a large surface of interaction is involved for Rpt1 binding. The interaction between Gankyrin/Nas6 and Rpt3 is mainly mediated by intermolecular interactions composed of complementary charged patches (Nakamura et al., 2007a; Nakamura et al., 2007b). In Rpt1, the charge distribution is quite different emphasizing that the C-terminal domain has markedly diverged among the ATPase subunits and that binding can exhibit a highly selectivity. Indeed, Gankyrin/Nas6 does not interact with any of the other RP ATPases (Dawson et al., 2002), and neither does Hsm3. Moreover, Nas6 interacts with an RP complex containing Rpn10 and its binding to the RP complex is negatively regulated by ATP (Verma et al., 2000) unlike Hsm3 binding.

The overall organization of the base is still a matter of debate (Rosenzweig et al., 2008), the relative orientation of the Rpt subunits within the hexamer ring is not known, and none full-length experimental structure of any of the six ATPases of the 19S RP has been solved. In the homo-hexameric structures of prokaryotic related ATPases such as FtsH, HslU or ClpA (Ogura and Wilkinson, 2001), the structure corresponding to the C-terminal region of Rpt1 is distal from the center of the ATPase ring. Our data combined with Nas6/Rpt3 structural data are consistent with the C-terminal part of the neighboring Rpt1 and Rpt3 being free.

Arm/HEAT repeats in proteins regulating proteasome structure and function

Hsm3/S5b are Arm/HEAT repeats containing proteins that form elongated α solenoid shape structures. Analysis of circular dichroism spectrum confirmed that most of the recombinant Hsm3 is in the alpha-helix conformation (F. Ochsenbein and A.P., unpublished data). Six lid subunits contain similar Arm/HEAT domains (Scheel and Hofmann, 2005). Rpn1 and Rpn2 base subunits share similar motifs and would adopt toroidal shape (Kajava, 2002) (Rosenzweig et al., 2008). Moreover, several other proteasome-associated proteins such as Ecm29, Blm10/PA200 are almost entirely composed of these repeats (Kajava et al., 2004).

Six lid subunits, Rpn1 and Rpn2 base subunits and several other proteasome-associated proteins such as Ecm29, Blm10/PA200 contain similar Arm/HEAT domains (Kajava, 2002; Kajava et al., 2004; Scheel and Hofmann, 2005; Rosenzweig et al., 2008). Hence, this structural motif is common in proteasome-associated proteins. However, at least some of these proteins might use different modes and/or domains of interaction with their proteasomal targets. Rpn1 and Rpn2 have been shown to interact with several ATPases of the base. Rpn1 can associate with an Rpt1-Rpt2 dimer (Gorbea et al., 2000). It is unlikely that the chaperoning role of Hsm3 is through mimicking these interactions inside the base. First, we show that Hsm3 interacts with a complex containing both ATPase subunits and the non-ATPase subunits Rpn1/2. Second, S5b has been shown to form a tetramer along with the Rpn1-Rpt1-Rpt2 trimer (Gorbea et al., 2000). Hence, Rpn1 interaction with Rpt1-Rpt2 dimer probably does not encompass the C-terminal domain of Rpt1. Moreover, since Hsm3 can associate with the base (but devoid of Rpn10), it is plausible that the C-terminal domain of Rpt1 is not buried within the free base.

Regulation of RP-CP association by Hsm3

Overexpression of Hsm3 induces a dramatic decrease in the association between the 19S and the 20S proteasome, though it does not perturb the association within base subunits nor lid association with the base. These results suggest that Hsm3 regulates the interface between the base and the α -ring rather than the lid/base interface. Individual 19S ATPase's C termini have distinct functions and some are involved in the complex formation with 20S and/or in gating (Smith et al., 2007). The loss of the penultimate tyrosine in the C-terminal tail of Rpt1 markedly interferes with 26S stability since substitution into an alanine of this conserved tyrosine in Rpt1 prevents the purification of 26S particles by standard affinity purification methods (Smith et al., 2007). Hsm3 interacts directly with the carboxyterminal domain of Rpt1. Truncation of the penultimate tyrosine of Rpt1 or its replacement by an alanine does not significantly perturb its interaction with Hsm3 in the two-hybrid system (our unpublished data). Hence, a lack of interaction between Hsm3 and Rpt1 is unlikely responsible for the assembly defects observed in the penultimate tyrosine mutant of Rpt1. Nevertheless, it does not preclude the attractive possibility that Hsm3 regulates the association between CP and RP by regulating the accessibility of the C-terminal tail of Rpt1.

Mechanism of Hsm3 dissociation from 19S complexes

Since Hsm3 is mainly associated with the base of the RP but to a lesser extent with the lid, it is plausible that Hsm3 is at least partially dissociated upon the arrival of the lid subcomplex. Our experimental lines fit with this hypothesis: we observed an accumulation of Hsm3 associated with the base in *sem1Δ* cells which are deficient for the lid assembly (our unpublished data). This observation could also explain the toxicity of Hsm3 in a *sem1Δ* context: the few competent RP assembled in *sem1Δ* cells may have difficulties in assembling with 20S particles with the sustained presence of Hsm3 on the 19S caps. An alternative explanation is that reducing the formation the somehow toxic base-20S intermediates formed in *sem1Δ*, the deletion of Hsm3 overcomes a dead-end assembly pathway. Such interactions were previously observed between chaperones of the 20S assembly ((Li et al., 2007) and our unpublished data).

Hence, the presence of Hsm3 could help distinguish competent RP species that can associate with 20S versus non-competent forms of the RP. Since a part of Hsm3 is associated with the whole RP, it is possible that the dissociation of Hsm3 is under the control of an additional mechanism, perhaps coupled with the association with the 20S and/or the gate opening.

Regulation of Hsm3 level

One intriguing observation is that both the invalidation and the overexpression of *HSM3* trigger defects in proteasome assembly. The half-life of Hsm3 is rather short and is modulated in several proteasome mutants (our unpublished results). Increasing the level of Hsm3 by overexpression or stabilization clearly perturbs the association between 19S and 20S. This indicates that a fine-tuning of Hsm3 level is required for optimal proteasome functioning.

The role of chaperones

A chaperone can be defined as a supervisor that accompanies and guides usually with the specific intent of preventing inappropriate interactions. Assembly chaperones ensure a correct assembly of a dedicated-complex possibly in two ways: they may accelerate the incorporation of the right subunits at the right place and they also may inhibit inappropriate binding of certain subunits, which could lead to dead-end complexes. To do so, they may protect hydrophobic surfaces prone to associate in a non-specific manner. Noteworthy, the 20S chaperone pair PAC1-PAC2 disfavors α -ring dimers formation and Poc3-Poc4 limits the association between $\alpha 3$ and $\alpha 5$ 20S subunits (Hirano et al., 2005; Kusmierczyk et al., 2008; Yashiroda et al., 2008). Interestingly, co-translation of hRpt1-hRpt2 was found to yield tetramer formation, which was reduced upon the presence of S5b (Gorbea et al., 2000).

In contrast with most of the 26S proteasome subunits, none of the yeast proteasome-dedicated chaperones identified so far is essential for growth in normal conditions (Ramos et al., 1998) (Le Tallec et al., 2007). One plausible explanation is that self-assembly of proteasome subcomplexes is sufficient to ensure growth in normal conditions. However, self-assembly may be less efficient because upon stressful conditions that increase the demands on proteasome, a chaperone such as Hsm3 becomes required for growth.

Experimental procedures

Standard techniques

Standard techniques, yeast strains, plasmids used in this study are described in Supplemental Experimental Procedures.

Immunoprecipitation experiments

Cleared extracts were prepared from TAP-tagged strains in a mortar in presence of liquid nitrogen using extraction buffer (50mM Tris-HCl pH 7.5, 2mM ATP, 5mM MgCl₂, 1 mM DTT, 15% glycerol) as previously described (Le Tallec et al., 2007). NaCl and NP40 were then added to a final concentration of 100mM and 0,5% respectively. Routinely 200µg of total proteins (but 1mg for Hsm3-TAP extracts) were incubated for 3h at 10°C in presence of antiPan mouse DYNAbeads (Dyna® Invitrogen) first incubated in presence of 0,1% BSA and equilibrated in lysis buffer supplemented with NaCl and NP-40. After washing, the bound proteins were eluted with Laemmli sample buffer. Immunoblot analysis for the TAP tag was performed using PAP complex (SIGMA-Aldrich). Other immunoprecipitation experiments were performed as described in (Le Tallec et al., 2007).

Gel filtration analyses

Gel filtration analyses of yeast whole cell extracts were performed as previously described (Ramos et al., 1998; Le Tallec et al., 2007). In experiments designed to analyze mutant defects, wild-type and mutant cells were shifted at 37°C for 6 hours before being harvested.

Native polyacrylamide gel electrophoresis

Native gel electrophoresis was carried out as described in (Dohmen et al., 2005). 75 µg to 150µg of proteins equivalent of total lysates (prepared as for gel filtration analyses) were loaded. Samples were run at 30mA for 15 min and then at 2mA for 16 hours at 4°C. Staining native gels for LLVY-AMC hydrolysis activity was done in 50 mM Tris-HCl [pH 7.4], 5 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 0.05 µM LLVY-AMC (Biomol). Blotting was performed in the presence of 0,1% SDS as described in standard techniques (Suppl Experimental procedures).

Assays for Proteolytic Activities

Assays were carried out from CMY960, BLT117 and BLT118 cells shifted at 37°C for 6 hours. Chymotrypsin-like activity was measured as described in (Dohmen et al., 2005). 150µL of each gel filtration fraction was mixed with Suc-LLY-AMC (Biomol) to 100µg/mL in a final volume of 200µL. The release of fluorescent cleaved substrate was measured at 440nm using an excitation wavelength at 380nm over 60 min.

Two-hybrid experiments

The hunt procedure was carried out as described in (Fromont-Racine et al., 1997) using the FRYL library DNA cloned into the pACT2 plasmid introduced into the Y190 strain. The bait was cloned into pGBT9 vector and introduced into Y187 strain. As we used the Y190 strain, which has a leaky *HIS3* reporter gene, the selection of positive diploids was performed in the presence of 3-aminotriazol (3AT 7.5 mM final). Positive diploids were spotted onto selective

plates and incubated for 1 or 2 days at 30°C. 10mL of X-Gal mixture (0.5% agarose, 0.1% SDS, 6% dimethylformamide and 0.04% X-Gal) was then poured onto the plates. Blue coloration was monitored during 30 min to 18h. DNA inserts corresponding to the positive hits were amplified by PCR with oligonucleotides specific to the pACT2 vector. Amplicons were treated with Exonuclease I (New England Biolabs) and Shrimp Alkaline Phosphatase (Promega) before being analyzed by sequencing. A similar experimental procedure (*ie* a mating procedure) was used for testing specific interactions.

Purification of recombinant Hsm3 and Rpt1 proteins

His-GST-HSM3 and/or Rpt1_[377-467]-MBP (Maltose Binding Protein) were (co)-expressed in *E. coli* using a derivative of pRSF-Duet-1 vector (Novagen). Sequences and details on constructions are available on demand. Transformed BL21 (DE3) cells were grown overnight at 37°C in Magic Media (Invitrogen). Whole-cell extracts correspond to bacterial cells directly lysed in Laemmli-SDS sample buffer. To separate soluble and insoluble proteins, cell pellets were lysed in buffer C' (Tris 50mM (pH7.5), 200mM NaCl, 1mM EDTA, 1 mM DTT, 0.05% Tween-20), sonicated and centrifuged at 10.000g for 15 min. Supernatant (soluble fraction) and pellet (insoluble fractions) were analysed by SDS-PAGE and Coomassie staining. For purification of MBP fusion proteins, soluble lysates were loaded onto amylose resin (New England Biolabs). After several washes with buffer C', the bound proteins were eluted by addition of maltose (10mM final). Ni-NTA magnetic agarose beads (QIAGEN) were added to fractions in buffer C (Tris 50mM (pH 7.5), 300mM NaCl, 0.05% Tween-20) in the presence of 10mM imidazole. Beads were washed with buffer C plus 20mM imidazole. Bound proteins were eluted in the same buffer adjusted to 250mM imidazole.

Sequence analyses and structural modeling

Sequence analyses were performed using PSI-Blast (Altschul et al., 1997) program on the nr database coupled to the profile-profile comparison method HHsearch (Soding, 2005). Structural models were calculated using Modeler 8v2 (Sali and Blundell, 1993) and evaluated using Prosa (Sippl, 1993) and Verify3D (Luthy et al., 1992) scores at the CBS server facilities (Douguet and Labesse, 2001). Conservation grades were calculated using the Rate4Site algorithm (Pupko et al., 2002).

Acknowledgments

We thank Willy Aucher for providing us Y187 strain transformed with FRYL library, M. Rechsteiner and E. Rousseau for their gift of S5b and hRpt1 cDNAs respectively, C. Mann for his gift of strains, anti-Cim3 and anti-Cim5 antibodies, J. Dohmen for his gift of proteasome tools, and F. Ochsenbein for circular dichroism spectroscopy experiments. We are grateful to M-C. Marsolier-Kergoat for her continuous support, her critical reading of the manuscript and helpful discussions. B.L.T. was supported by a grant from the Association pour la Recherche sur le Cancer. This work was financed by the CEA, by the Association pour la Recherche sur le Cancer and by the Agence Nationale de la Recherche.

References

- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25, 3389-3402.
- Baumeister, W., Walz, J., Zuhl, F., and Seemuller, E. (1998). The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell* 92, 367-380.
- Becker, E., Meyer, V., Madaoui, H., and Guerois, R. (2006). Detection of a tandem BRCT in Nbs1 and Xrs2 with functional implications in the DNA damage response. *Bioinformatics* 22, 1289-1292.
- Chen, P., and Hochstrasser, M. (1996). Autocatalytic subunit processing couples active site formation in the 20S proteasome to completion of assembly. *Cell* 86, 961-972.
- Collins, S.R., Miller, K.M., Maas, N.L., Roguev, A., Fillingham, J., Chu, C.S., Schuldiner, M., Gebbia, M., Recht, J., Shales, M., *et al.* (2007). Functional dissection of protein complexes involved in yeast chromosome biology using a genetic interaction map. *Nature* 446, 806-810.
- Dawson, S., Apcher, S., Mee, M., Higashitsuji, H., Baker, R., Uhle, S., Dubiel, W., Fujita, J., and Mayer, R.J. (2002). Gankyrin is an ankyrin-repeat oncoprotein that interacts with CDK4 kinase and the S6 ATPase of the 26 S proteasome. *J Biol Chem* 277, 10893-10902.
- DeMartino, G.N., Moomaw, C.R., Zagnitko, O.P., Proske, R.J., Chu-Ping, M., Afendis, S.J., Swaffield, J.C., and Slaughter, C.A. (1994). PA700, an ATP-dependent activator of the 20 S proteasome, is an ATPase containing multiple members of a nucleotide-binding protein family. *J Biol Chem* 269, 20878-20884.
- Deveraux, Q., Jensen, C., and Rechsteiner, M. (1995). Molecular cloning and expression of a 26 S protease subunit enriched in dileucine repeats. *J Biol Chem* 270, 23726-23729.
- Dohmen, R.J., London, M.K., Glanemann, C., and Ramos, P.C. (2005). Assays for proteasome assembly and maturation. *Methods Mol Biol* 301, 243-254.
- Douguet, D., and Labesse, G. (2001). Easier threading through web-based comparisons and cross-validations. *Bioinformatics* 17, 752-753.
- Elsasser, S., Gali, R.R., Schwickart, M., Larsen, C.N., Leggett, D.S., Muller, B., Feng, M.T., Tubing, F., Dittmar, G.A., and Finley, D. (2002). Proteasome subunit Rpn1 binds ubiquitin-like protein domains. *Nat Cell Biol* 4, 725-730.
- Elsasser, S., Schmidt, M., and Finley, D. (2005). Characterization of the proteasome using native gel electrophoresis. *Methods Enzymol* 398, 353-363.
- Fedorova, I.V., Kovaltzova, S.V., and Korolev, V.G. (2000). The yeast HSM3 gene is involved in DNA mismatch repair in slowly dividing cells. *Genetics* 154, 495-496.
- Fromont-Racine, M., Rain, J.C., and Legrain, P. (1997). Toward a functional analysis of the yeast genome through exhaustive two-hybrid screens. *Nat Genet* 16, 277-282.
- Funakoshi, M., Li, X., Velichutina, I., Hochstrasser, M., and Kobayashi, H. (2004). Sem1, the yeast ortholog of a human BRCA2-binding protein, is a component of the proteasome regulatory particle that enhances proteasome stability. *J Cell Sci* 117, 6447-6454.
- Gavin, A.C., Bosche, M., Krause, R., Grandi, P., Marzioch, M., Bauer, A., Schultz, J., Rick, J.M., Michon, A.M., Cruciat, C.M., *et al.* (2002). Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* 415, 141-147.
- Ghislain, M., Udvardy, A., and Mann, C. (1993). *S. cerevisiae* 26S protease mutants arrest cell division in G2/metaphase. *Nature* 366, 358-362.

- Giot, L., Bader, J.S., Brouwer, C., Chaudhuri, A., Kuang, B., Li, Y., Hao, Y.L., Ooi, C.E., Godwin, B., Vitols, E., *et al.* (2003). A protein interaction map of *Drosophila melanogaster*. *Science* 302, 1727-1736.
- Glickman, M.H., and Ciechanover, A. (2002). The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* 82, 373-428.
- Glickman, M.H., Rubin, D.M., Cux, O., Wefes, I., Pfeifer, G., Cjeka, Z., Baumeister, W., Fried, V.A., and Finley, D. (1998a). A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3. *Cell* 94, 615-623.
- Glickman, M.H., Rubin, D.M., Fried, V.A., and Finley, D. (1998b). The regulatory particle of the *Saccharomyces cerevisiae* proteasome. *Mol Cell Biol* 18, 3149-3162.
- Goldberg, A.L. (2007). Functions of the proteasome: from protein degradation and immune surveillance to cancer therapy. *Biochem Soc Trans* 35, 12-17.
- Gorbea, C., Taillandier, D., and Rechsteiner, M. (2000). Mapping subunit contacts in the regulatory complex of the 26 S proteasome. S2 and S5b form a tetramer with ATPase subunits S4 and S7. *J Biol Chem* 275, 875-882.
- Groll, M., Bajorek, M., Kohler, A., Moroder, L., Rubin, D.M., Huber, R., Glickman, M.H., and Finley, D. (2000). A gated channel into the proteasome core particle. *Nat Struct Biol* 7, 1062-1067.
- Groll, M., Ditzel, L., Lowe, J., Stock, D., Bochtler, M., Bartunik, H.D., and Huber, R. (1997). Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature* 386, 463-471.
- Hamazaki, J., Iemura, S., Natsume, T., Yashiroda, H., Tanaka, K., and Murata, S. (2006). A novel proteasome interacting protein recruits the deubiquitinating enzyme UCH37 to 26S proteasomes. *EMBO J* 25, 4524-4536.
- Hirano, Y., Hayashi, H., Iemura, S., Hendil, K.B., Niwa, S., Kishimoto, T., Kasahara, M., Natsume, T., Tanaka, K., and Murata, S. (2006). Cooperation of multiple chaperones required for the assembly of mammalian 20S proteasomes. *Mol Cell* 24, 977-984.
- Hirano, Y., Hendil, K.B., Yashiroda, H., Iemura, S., Nagane, R., Hioki, Y., Natsume, T., Tanaka, K., and Murata, S. (2005). A heterodimeric complex that promotes the assembly of mammalian 20S proteasomes. *Nature* 437, 1381-1385.
- Ho, Y., Gruhler, A., Heilbut, A., Bader, G.D., Moore, L., Adams, S.L., Millar, A., Taylor, P., Bennett, K., Boutilier, K., *et al.* (2002). Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. *Nature* 415, 180-183.
- Hoffman, L., Pratt, G., and Rechsteiner, M. (1992). Multiple forms of the 20 S multicatalytic and the 26 S ubiquitin/ATP-dependent proteases from rabbit reticulocyte lysate. *J Biol Chem* 267, 22362-22368.
- Hoyt, M.A., McDonough, S., Pimpl, S.A., Scheel, H., Hofmann, K., and Coffino, P. (2008). A genetic screen for *Saccharomyces cerevisiae* mutants affecting proteasome function, using a ubiquitin-independent substrate. *Yeast* 25, 199-217.
- Husnjak, K., Elsasser, S., Zhang, N., Chen, X., Randles, L., Shi, Y., Hofmann, K., Walters, K.J., Finley, D., and Dikic, I. (2008). Proteasome subunit Rpn13 is a novel ubiquitin receptor. *Nature* 453, 481-488.
- Isono, E., Nishihara, K., Saeki, Y., Yashiroda, H., Kamata, N., Ge, L., Ueda, T., Kikuchi, Y., Tanaka, K., Nakano, A., and Toh, E.A. (2007). The Assembly Pathway of the 19S Regulatory Particle of the Yeast 26S Proteasome. *Mol Biol Cell* 18, 569-580.

- Isono, E., Saeki, Y., Yokosawa, H., and Toh-e, A. (2004). Rpn7 Is required for the structural integrity of the 26 S proteasome of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 279, 27168-27176.
- Isono, E., Saito, N., Kamata, N., Saeki, Y., and Toh, E.A. (2005). Functional analysis of Rpn6p, a lid component of the 26 S proteasome, using temperature-sensitive rpn6 mutants of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 280, 6537-6547.
- Ito, T., Chiba, T., Ozawa, R., Yoshida, M., Hattori, M., and Sakaki, Y. (2001). A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 4569-4574.
- Iwanczyk, J., Sadre-Bazzaz, K., Ferrell, K., Kondrashkina, E., Formosa, T., Hill, C.P., and Ortega, J. (2006). Structure of the Bln10-20 S proteasome complex by cryo-electron microscopy. Insights into the mechanism of activation of mature yeast proteasomes. *J Mol Biol* 363, 648-659.
- Kajava, A.V. (2002). What curves alpha-solenoids? Evidence for an alpha-helical toroid structure of Rpn1 and Rpn2 proteins of the 26 S proteasome. *J Biol Chem* 277, 49791-49798.
- Kajava, A.V., Gorbea, C., Ortega, J., Rechsteiner, M., and Steven, A.C. (2004). New HEAT-like repeat motifs in proteins regulating proteasome structure and function. *J Struct Biol* 146, 425-430.
- Kohler, A., Cascio, P., Leggett, D.S., Woo, K.M., Goldberg, A.L., and Finley, D. (2001). The axial channel of the proteasome core particle is gated by the Rpt2 ATPase and controls both substrate entry and product release. *Mol Cell* 7, 1143-1152.
- Krogan, N.J., Lam, M.H., Fillingham, J., Keogh, M.C., Gebbia, M., Li, J., Datta, N., Cagney, G., Buratowski, S., Emili, A., and Greenblatt, J.F. (2004). Proteasome involvement in the repair of DNA double-strand breaks. *Mol Cell* 16, 1027-1034.
- Kusmierczyk, A.R., Kunjappu, M.J., Funakoshi, M., and Hochstrasser, M. (2008). A multimeric assembly factor controls the formation of alternative 20S proteasomes. *Nat Struct Mol Biol* 15, 237-244.
- Lam, Y.A., Lawson, T.G., Velayutham, M., Zweier, J.L., and Pickart, C.M. (2002). A proteasomal ATPase subunit recognizes the polyubiquitin degradation signal. *Nature* 416, 763-767.
- Lassot, I., Latreille, D., Rousset, E., Sourisseau, M., Linares, L.K., Chable-Bessia, C., Coux, O., Benkirane, M., and Kiernan, R.E. (2007). The proteasome regulates HIV-1 transcription by both proteolytic and nonproteolytic mechanisms. *Mol Cell* 25, 369-383.
- Le Tallec, B., Barrault, M.B., Courbeyrette, R., Guerois, R., Marsolier-Kergoat, M.C., and Peyroche, A. (2007). 20S proteasome assembly is orchestrated by two distinct pairs of chaperones in yeast and in mammals. *Mol Cell* 27, 660-674.
- Leggett, D.S., Hanna, J., Borodovsky, A., Crosas, B., Schmidt, M., Baker, R.T., Walz, T., Ploegh, H., and Finley, D. (2002). Multiple associated proteins regulate proteasome structure and function. *Mol Cell* 10, 495-507.
- Lehmann, A., Janek, K., Braun, B., Kloetzel, P.M., and Enenkel, C. (2002). 20 S proteasomes are imported as precursor complexes into the nucleus of yeast. *J Mol Biol* 317, 401-413.
- Li, S., Armstrong, C.M., Bertin, N., Ge, H., Milstein, S., Boxem, M., Vidalain, P.O., Han, J.D., Chesneau, A., Hao, T., *et al.* (2004). A map of the interactome network of the metazoan *C. elegans*. *Science* 303, 540-543.

- Li, X., Kusmierczyk, A.R., Wong, P., Emili, A., and Hochstrasser, M. (2007). beta-Subunit appendages promote 20S proteasome assembly by overcoming an Ump1-dependent checkpoint. *Embo J* 26, 2339-2349.
- Liu, C.W., Li, X., Thompson, D., Wooding, K., Chang, T.L., Tang, Z., Yu, H., Thomas, P.J., and DeMartino, G.N. (2006). ATP binding and ATP hydrolysis play distinct roles in the function of 26S proteasome. *Mol Cell* 24, 39-50.
- London, M.K., Keck, B.I., Ramos, P.C., and Dohmen, R.J. (2004). Regulatory mechanisms controlling biogenesis of ubiquitin and the proteasome. *FEBS Lett* 567, 259-264.
- Luthy, R., Bowie, J.U., and Eisenberg, D. (1992). Assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Nature* 356, 83-85.
- Marchler-Bauer, A., Anderson, J.B., Derbyshire, M.K., DeWeese-Scott, C., Gonzales, N.R., Gwadz, M., Hao, L., He, S., Hurwitz, D.I., Jackson, J.D., *et al.* (2007). CDD: a conserved domain database for interactive domain family analysis. *Nucleic Acids Res* 35, D237-240.
- Marques, A.J., Glanemann, C., Ramos, P.C., and Dohmen, R.J. (2007). The C-terminal extension of the beta7 subunit and activator complexes stabilize nascent 20 S proteasomes and promote their maturation. *J Biol Chem* 282, 34869-34876.
- Merker, J.D., Datta, A., Kolodner, R.D., and Petes, T.D. (2000). The yeast HSM3 gene is not involved in DNA mismatch repair in rapidly dividing cells. *Genetics* 154, 491-493.
- Nakamura, Y., Nakano, K., Umehara, T., Kimura, M., Hayashizaki, Y., Tanaka, A., Horikoshi, M., Padmanabhan, B., and Yokoyama, S. (2007a). Structure of the oncoprotein gankyrin in complex with S6 ATPase of the 26S proteasome. *Structure* 15, 179-189.
- Nakamura, Y., Umehara, T., Tanaka, A., Horikoshi, M., Padmanabhan, B., and Yokoyama, S. (2007b). Structural basis for the recognition between the regulatory particles Nas6 and Rpt3 of the yeast 26S proteasome. *Biochem Biophys Res Commun* 359, 503-509.
- Ogura, T., and Wilkinson, A.J. (2001). AAA+ superfamily ATPases: common structure--diverse function. *Genes Cells* 6, 575-597.
- Pan, X., Ye, P., Yuan, D.S., Wang, X., Bader, J.S., and Boeke, J.D. (2006). A DNA integrity network in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* 124, 1069-1081.
- Park, Y., Hwang, Y.P., Lee, J.S., Seo, S.H., Yoon, S.K., and Yoon, J.B. (2005). Proteasomal ATPase-associated factor 1 negatively regulates proteasome activity by interacting with proteasomal ATPases. *Mol Cell Biol* 25, 3842-3853.
- Pupko, T., Bell, R.E., Mayrose, I., Glaser, F., and Ben-Tal, N. (2002). Rate4Site: an algorithmic tool for the identification of functional regions in proteins by surface mapping of evolutionary determinants within their homologues. *Bioinformatics* 18 Suppl 1, S71-77.
- Ramos, P.C., Hockendorff, J., Johnson, E.S., Varshavsky, A., and Dohmen, R.J. (1998). Ump1p is required for proper maturation of the 20S proteasome and becomes its substrate upon completion of the assembly. *Cell* 92, 489-499.
- Ramos, P.C., Marques, A.J., London, M.K., and Dohmen, R.J. (2004). Role of C-terminal extensions of subunits beta2 and beta7 in assembly and activity of eukaryotic proteasomes. *J Biol Chem* 279, 14323-14330.
- Rosenzweig, R., Osmulski, P.A., Gaczynska, M., and Glickman, M.H. (2008). The central unit within the 19S regulatory particle of the proteasome. *Nat Struct Mol Biol* 15, 573-580.
- Rubin, D.M., Glickman, M.H., Larsen, C.N., Dhruvakumar, S., and Finley, D. (1998). Active site mutants in the six regulatory particle ATPases reveal multiple roles for ATP in the proteasome. *EMBO J* 17, 4909-4919.
- Saeki, Y., and Tanaka, K. (2007). Unlocking the proteasome door. *Mol Cell* 27, 865-867.

- Saeki, Y., Toh-e, A., and Yokosawa, H. (2000). Rapid isolation and characterization of the yeast proteasome regulatory complex. *Biochem Biophys Res Commun* 273, 509-515.
- Sali, A., and Blundell, T.L. (1993). Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol* 234, 779-815.
- Santamaria, P.G., Finley, D., Ballesta, J.P., and Remacha, M. (2003). Rpn6p, a proteasome subunit from *Saccharomyces cerevisiae*, is essential for the assembly and activity of the 26 S proteasome. *J Biol Chem* 278, 6687-6695.
- Scheel, H., and Hofmann, K. (2005). Prediction of a common structural scaffold for proteasome lid, COP9-signalosome and eIF3 complexes. *BMC Bioinformatics* 6, 71.
- Schmidt, M., Hanna, J., Elsasser, S., and Finley, D. (2005). Proteasome-associated proteins: regulation of a proteolytic machine. *Biol Chem* 386, 725-737.
- Sippl, M.J. (1993). Recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Proteins* 17, 355-362.
- Smith, D.M., Benaroudj, N., and Goldberg, A. (2006). Proteasomes and their associated ATPases: a destructive combination. *J Struct Biol* 156, 72-83.
- Smith, D.M., Chang, S.C., Park, S., Finley, D., Cheng, Y., and Goldberg, A.L. (2007). Docking of the proteasomal ATPases' carboxyl termini in the 20S proteasome's alpha ring opens the gate for substrate entry. *Mol Cell* 27, 731-744.
- Soding, J. (2005). Protein homology detection by HMM-HMM comparison. *Bioinformatics* 21, 951-960.
- Sone, T., Saeki, Y., Toh-e, A., and Yokosawa, H. (2004). Sem1p is a novel subunit of the 26 S proteasome from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 279, 28807-28816.
- Takeuchi, J., Fujimuro, M., Yokosawa, H., Tanaka, K., and Toh-e, A. (1999). Rpn9 is required for efficient assembly of the yeast 26S proteasome. *Mol Cell Biol* 19, 6575-6584.
- Velichutina, I., Connerly, P.L., Arendt, C.S., Li, X., and Hochstrasser, M. (2004). Plasticity in eucaryotic 20S proteasome ring assembly revealed by a subunit deletion in yeast. *Embo J* 23, 500-510.
- Verma, R., Aravind, L., Oania, R., McDonald, W.H., Yates, J.R., 3rd, Koonin, E.V., and Deshaies, R.J. (2002). Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. *Science* 298, 611-615.
- Verma, R., Chen, S., Feldman, R., Schieltz, D., Yates, J., Dohmen, J., and Deshaies, R.J. (2000). Proteasomal proteomics: identification of nucleotide-sensitive proteasome-interacting proteins by mass spectrometric analysis of affinity-purified proteasomes. *Mol Biol Cell* 11, 3425-3439.
- Voges, D., Zwickl, P., and Baumeister, W. (1999). The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu Rev Biochem* 68, 1015-1068.
- Walhout, A.J., Reboul, J., Shtanko, O., Bertin, N., Vaglio, P., Ge, H., Lee, H., Doucette-Stamm, L., Gunsalus, K.C., Schetter, A.J., *et al.* (2002). Integrating interactome, phenome, and transcriptome mapping data for the *C. elegans* germline. *Curr Biol* 12, 1952-1958.
- Witt, S., Kwon, Y.D., Sharon, M., Felderer, K., Beuttler, M., Robinson, C.V., Baumeister, W., and Jap, B.K. (2006). Proteasome assembly triggers a switch required for active-site maturation. *Structure* 14, 1179-1188.
- Wolf, D.H., and Hilt, W. (2004). The proteasome: a proteolytic nanomachine of cell regulation and waste disposal. *Biochim Biophys Acta* 1695, 19-31.
- Xie, Y., and Varshavsky, A. (2001). RPN4 is a ligand, substrate, and transcriptional regulator of the 26S proteasome: a negative feedback circuit. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 3056-3061.

- Yao, T., and Cohen, R.E. (2002). A cryptic protease couples deubiquitination and degradation by the proteasome. *Nature* 419, 403-407.
- Yashiroda, H., Mizushima, T., Okamoto, K., Kameyama, T., Hayashi, H., Kishimoto, T., Niwa, S., Kasahara, M., Kurimoto, E., Sakata, E., *et al.* (2008). Crystal structure of a chaperone complex that contributes to the assembly of yeast 20S proteasomes. *Nat Struct Mol Biol* 15, 228-236.

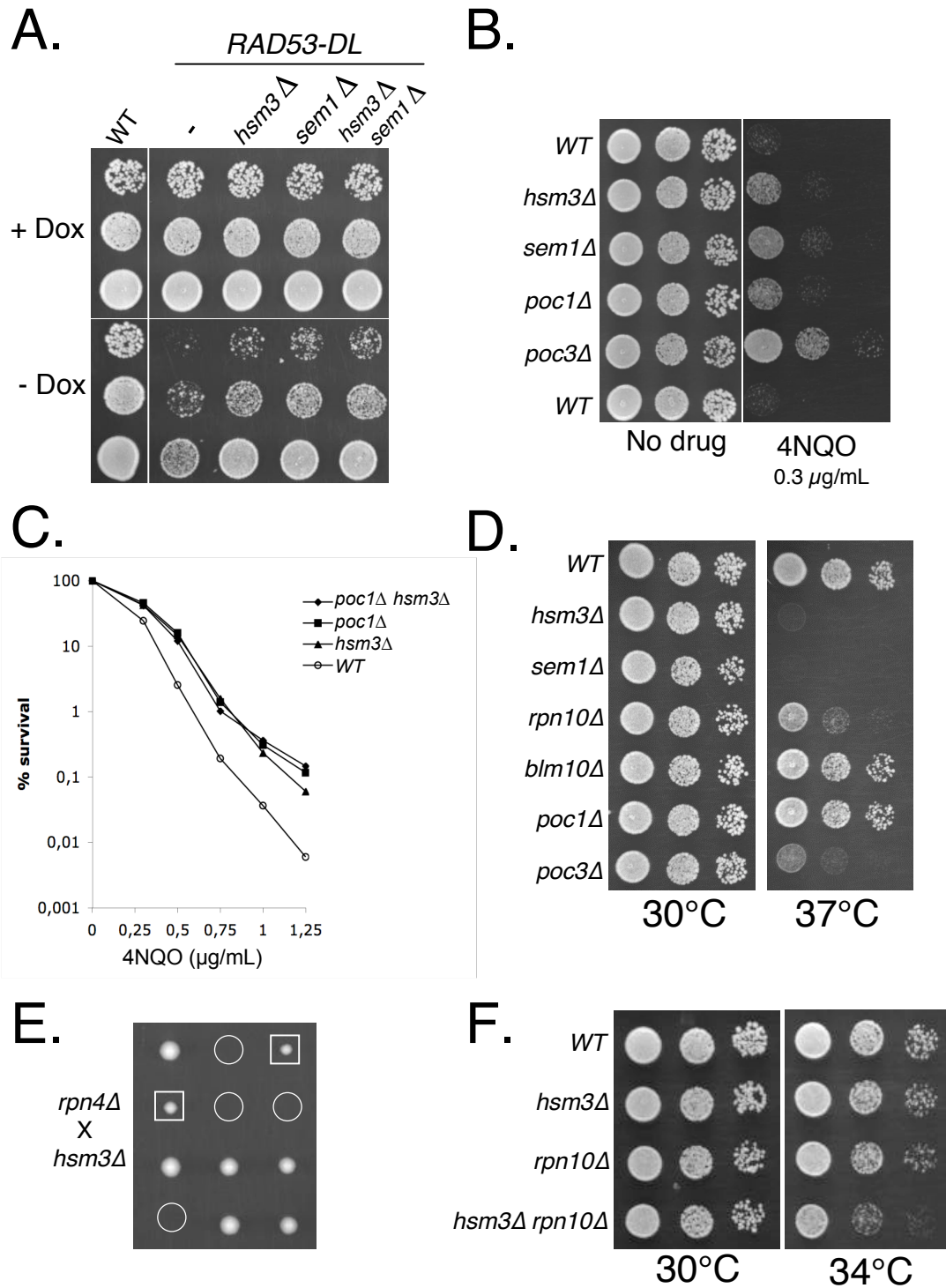


Figure 1. *HSM3* belongs to the proteasome group regarding the DNA damage response and is genetically linked to proteasome functions

A. Ten-fold serial dilutions of the indicated mutants in the *RAD53-DL* background were spotted onto YPD plates under permissive conditions (with doxycyclin (+ DOX)) or restrictive conditions (without doxycyclin (-DOX)). The wild type strain (WT) was spotted as a reference. Plates were incubated at 30°C for 2 days.

B. Ten-fold serial dilutions of the indicated mutants were spotted onto YPD plates (no drug) or YPD containing 4NQO (0.3μg/mL) and incubated for 2 days at 30°C.

C. Early exponential phase cells were plated onto YPD plates with the indicated concentrations of 4NQO. After incubation for 3 days at 30°C, viable colonies were counted. Relevant genotypes of the different congenic strains are indicated on the right.

D. Ten-fold serial dilutions of the indicated strains were spotted onto YPD plates and incubated at the indicated temperatures for 2 days.

E. Heterozygous double mutants were sporulated. The resulting tetrads were dissected and incubated at 30°C onto YPD plates. Circled are the colonies germinated from double mutant spores, squares indicate *rpn4Δ* single mutants.

F. Ten-fold serial dilutions of the indicated strains were spotted onto YPD plates and incubated at the indicated temperatures for 2 days.

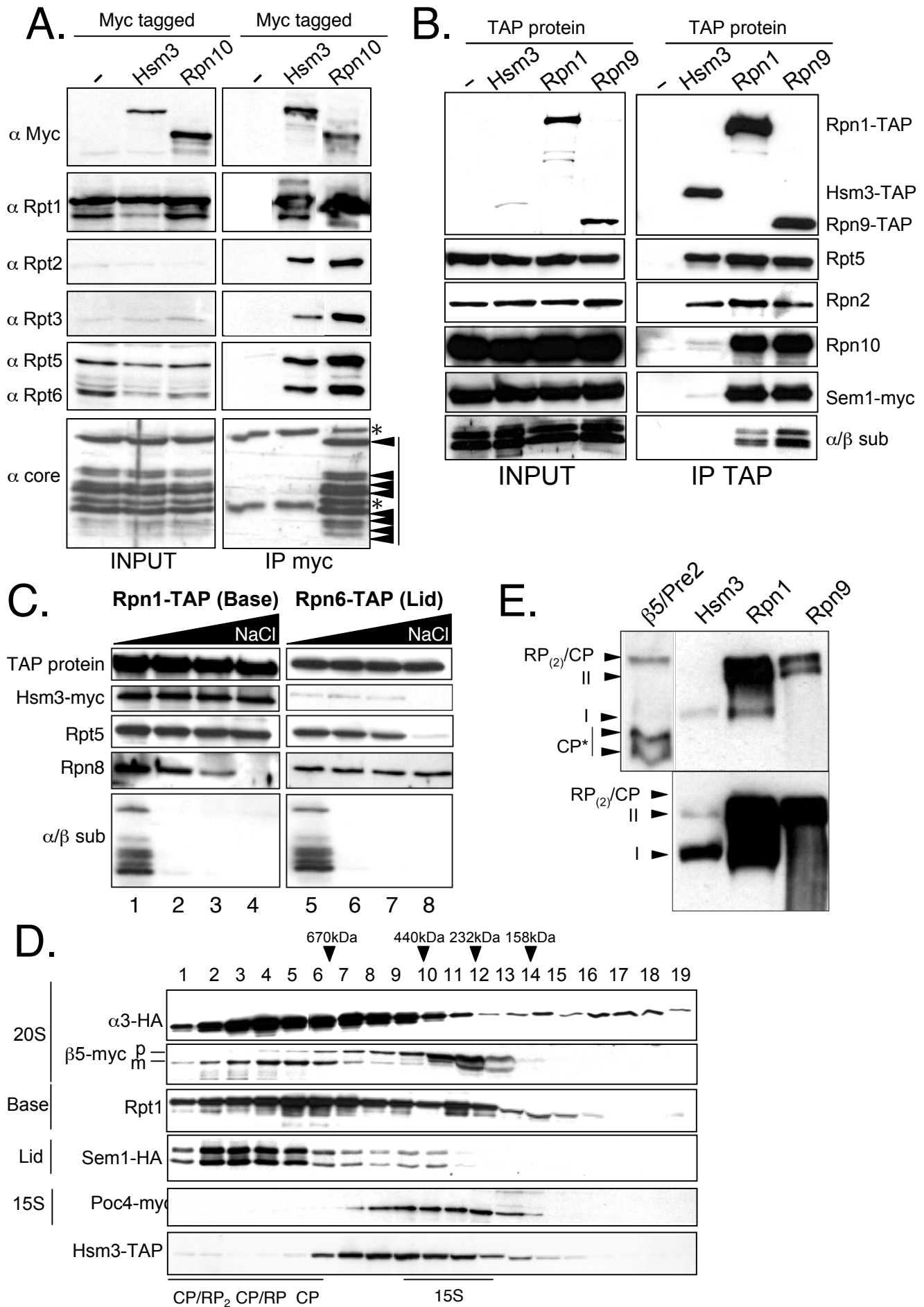


Figure 2. Hsm3 mainly interacts with a 19S base-like subcomplex

A. Lysates from strains expressing or not (-) Hsm3-myc or Rpn10-myc were immunoprecipitated with anti-Myc antibodies. Lysates (INPUT) and immunoprecipitates (IP myc) were analyzed by Western blotting with antibodies indicated on the left. Arrowheads indicate the different 20S-core subunits. Asterisks correspond to non-specific proteins including immunoglobulins.

B. Lysates from strains expressing (or not (-)) Hsm3-TAP or Rpn1-TAP (base) or Rpn9-TAP (lid) were pulled-down with IgG antibodies. Lysates (INPUT) and immunoprecipitates (IP TAP) were analyzed by Western blotting with different antibodies that recognize the proteins indicated on the right. 10µg of lysates were analyzed for each strain. IP equivalent to 25µg of total proteins for Rpn1-TAP and Rpn9-TAP and to 200µg of total proteins for Hsm3-TAP and control strain were analyzed. The experiment was performed with a Sem1-myc strain but similar results were obtained in an untagged Sem1 strain.

C. Lysates from strains expressing Hsm3-myc and Rpn1-TAP (base) or Rpn6-TAP (lid) were immunoprecipitated with IgG antibodies in the presence of increased salt concentrations (100mM, 300mM, 500mM and 1M of NaCl). Immunoprecipitates were analyzed by Western blotting with different antibodies as indicated on the left.

D. Crude extracts from strains expressing the indicated epitope-tagged versions of the proteins were fractionated by gel filtration on Superose 6. Relevant fractions were analyzed by Western blot. On the far left of the panel are indicated which proteasome sub-complexes the different proteins detected by western blot belong to. Poc4-myc associates with 20S assembly intermediates. Unprocessed precursors (p) and processed mature (m) forms of β5-subunit are indicated. Elution fractions corresponding to various proteasome species are indicated on the bottom of the panel. Arrowheads indicate the positions of the peaks of marker proteins. Each experiment was carried out at least three times and representative results are shown.

E. Extracts from congenic strains expressing Hsm3-tagged (Hsm3-TAP) or CP-tagged (β5/Pre2-myc), base-tagged (Rpn1-TAP) and lid-tagged (Rpn9-TAP) subunits were prepared as for gel filtration analysis (see Experimental Procedures). Extracts equivalent to 100µg were resolved by non-denaturing PAGE. The gel was subsequently subjected to Western blotting by using Myc-antibodies (β5/Pre2) or PAP complexes. Since the level of Hsm3-TAP is rather low compared to Rpn1 or Rpn9-TAP, different exposures of the same blot were performed (Upper panel : short exposure; lower panel : long exposure). Bands corresponding to various proteasome species are indicated on the far left of the panels. Note that in the conditions we used, RP₂-CP and RP-CP roughly comigrate. CP* correspond to various forms containing CP subunits but no RP subunits (CP and CP-Blm10 possibly). Complex I corresponded to species revealed with anti-TAP-Rpn1 and anti-Rpt5 antibodies but neither with anti TAP-Rpn9 nor anti-20S antibodies and is considered as a base-like complex. Complex II is revealed by anti-TAP-Rpn9, anti-TAP-Rpn1 antibody and also with anti- Rpt1, Rpt2 and Rpt5 antibodies (see Fig 3C) but not with anti-20S antibody and probably corresponded to 19S RP complex.

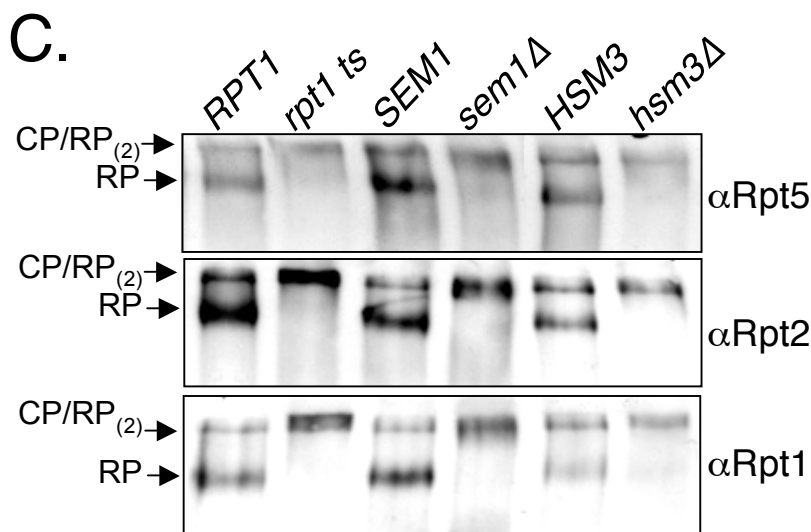
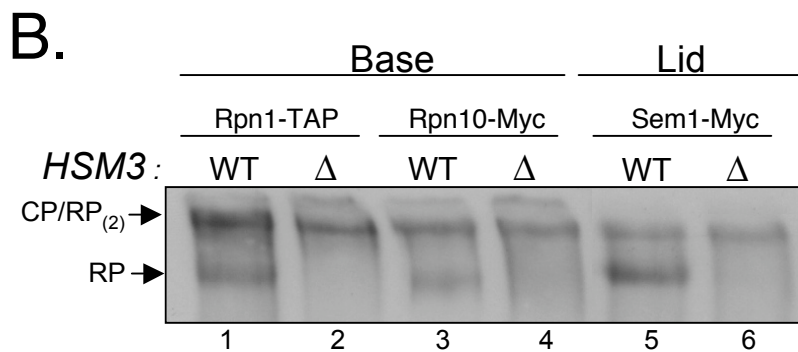
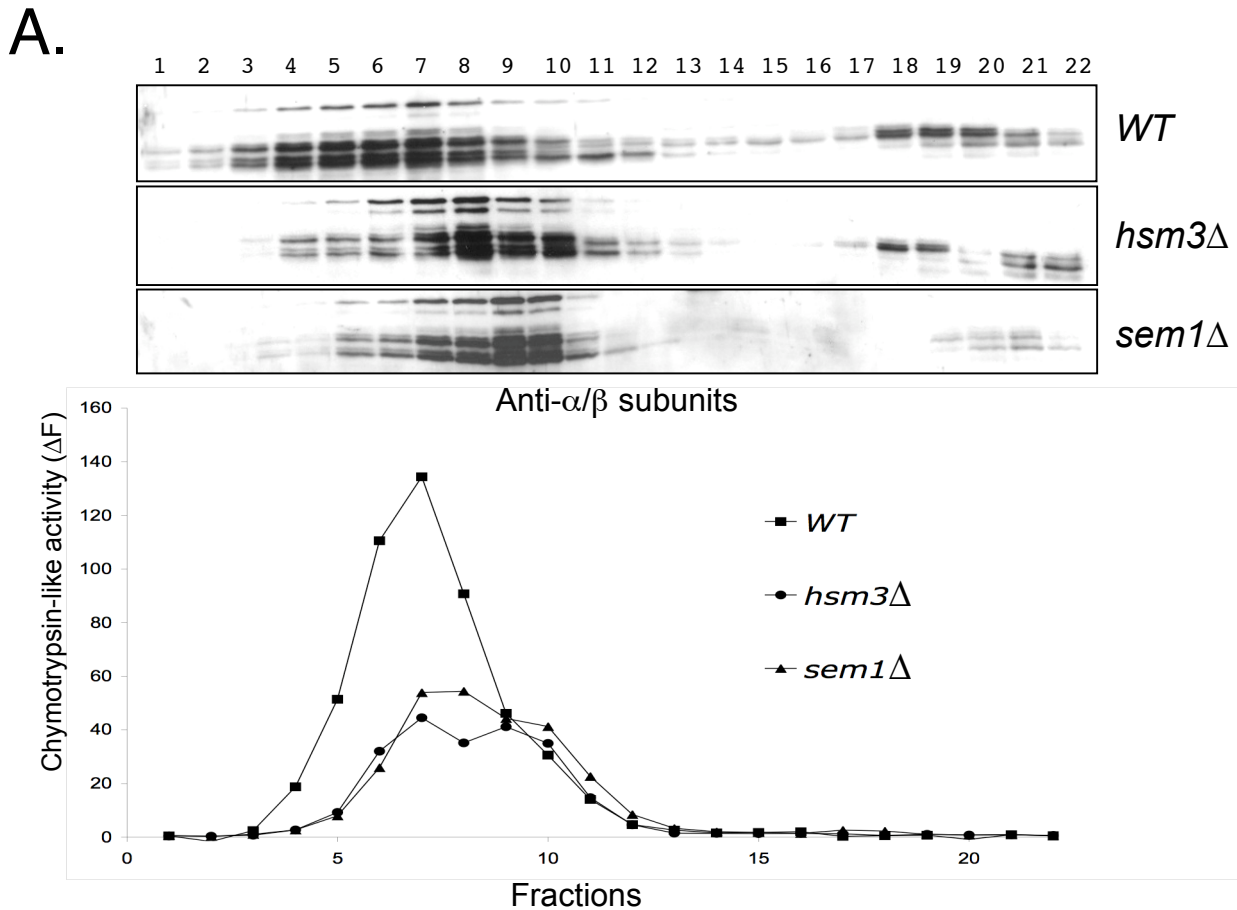


Figure 3. The absence of Hsm3 impairs proteasome functions

A. Exponential cultures of wild type (WT) and congenic *hsm3*Δ or *sem1*Δ cells were shifted at 37°C for 6 hours. Extracts were then prepared and loaded onto a Superose 6 column. Upper panel: Anti-20S core-α/β subunits immunoblot was performed on the resulting gel filtration fractions. Lower panel: Chymotrypsin-like activity using Suc-LLY-AMC substrate was measured in the resulting fractions.

B. Wild-type (WT) or congenic *hsm3*Δ (Δ) strains expressing base-tagged (Rpn1-TAP or Rpn10-myc) or lid-tagged (Sem1-myc) subunits were cultured for 6h at 37°C. Extracts equivalent to 50μg of protein were resolved on native PAGE. The gel was subjected to Western blotting by using anti-Myc antibodies. Note that Rpn1-TAP proteins were also revealed by the anti-Myc western blot procedure. Arrows indicate various proteasome species.

C. *rpt1-ts* (*cim5-1*), *sem1*Δ or *hsm3*Δ strains and wild-type congenic strains (*RPT1*, *SEM1* and *HSM3*) were cultured for 6h at 37°C. Extracts equivalent to 50μg of protein were analyzed by western blot following non-denaturing PAGE procedure using the different antibodies indicated on the right. Arrows indicate various proteasome species.

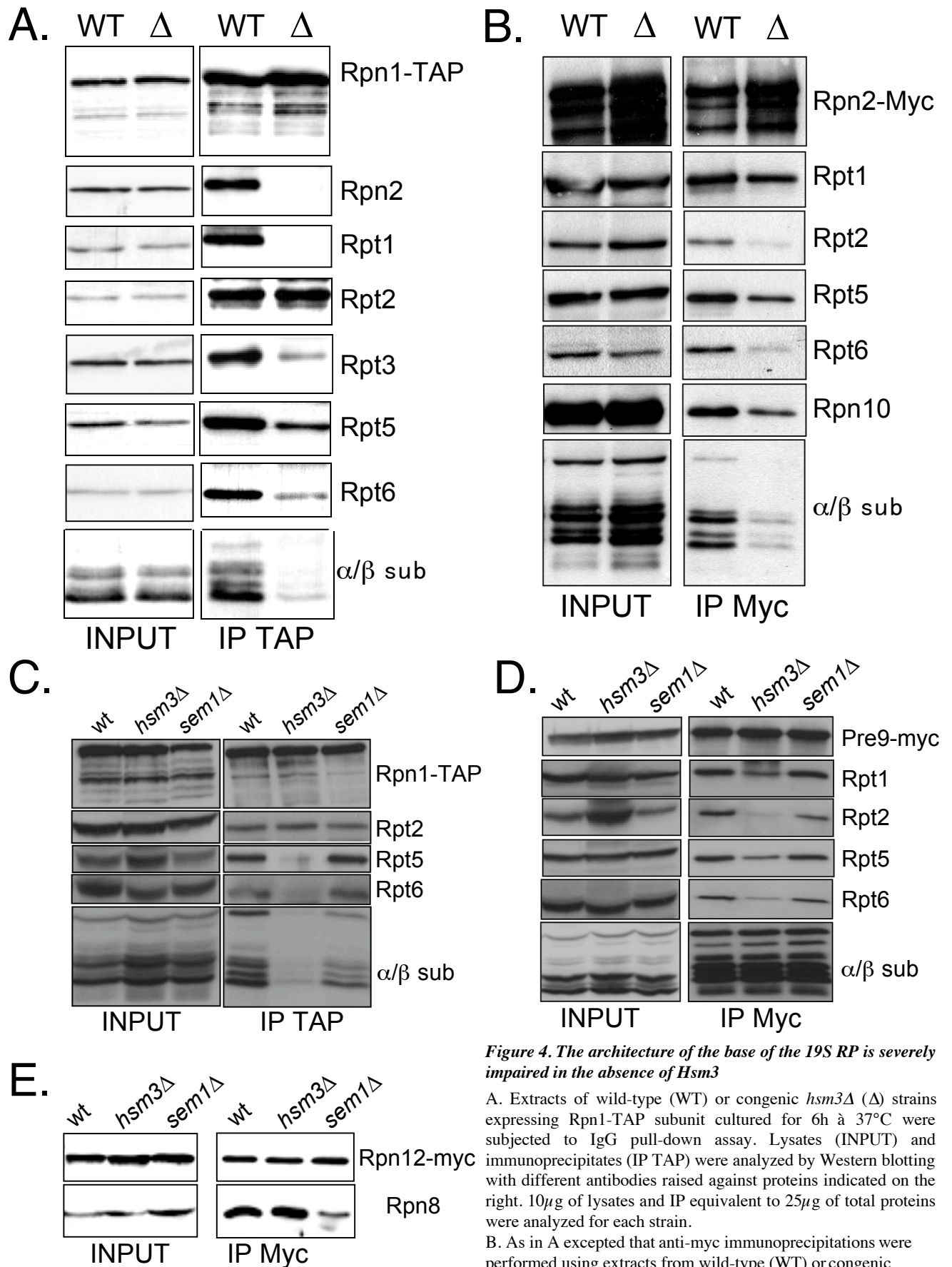


Figure 4. The architecture of the base of the 19S RP is severely impaired in the absence of Hsm3

A. Extracts of wild-type (WT) or congenic *hsm3* Δ (Δ) strains expressing Rpn1-TAP subunit cultured for 6h à 37°C were subjected to IgG pull-down assay. Lysates (INPUT) and immunoprecipitates (IP TAP) were analyzed by Western blotting with different antibodies raised against proteins indicated on the right. 10 μ g of lysates and IP equivalent to 25 μ g of total proteins were analyzed for each strain.

B. As in A excepted that anti-myc immunoprecipitations were performed using extracts from wild-type (WT) or congenic *hsm3* Δ (Δ) strains expressing Rpn2-myc.

C. As in A excepted that *sem1* Δ strain was also used for comparison to *hsm3* Δ strain.

D. As in C excepted that immunoprecipitation were carried out against Pre9-myc protein.

E. As in D excepted that Rpn12-myc protein was used to immunoprecipitate lid subunits containing complexes.

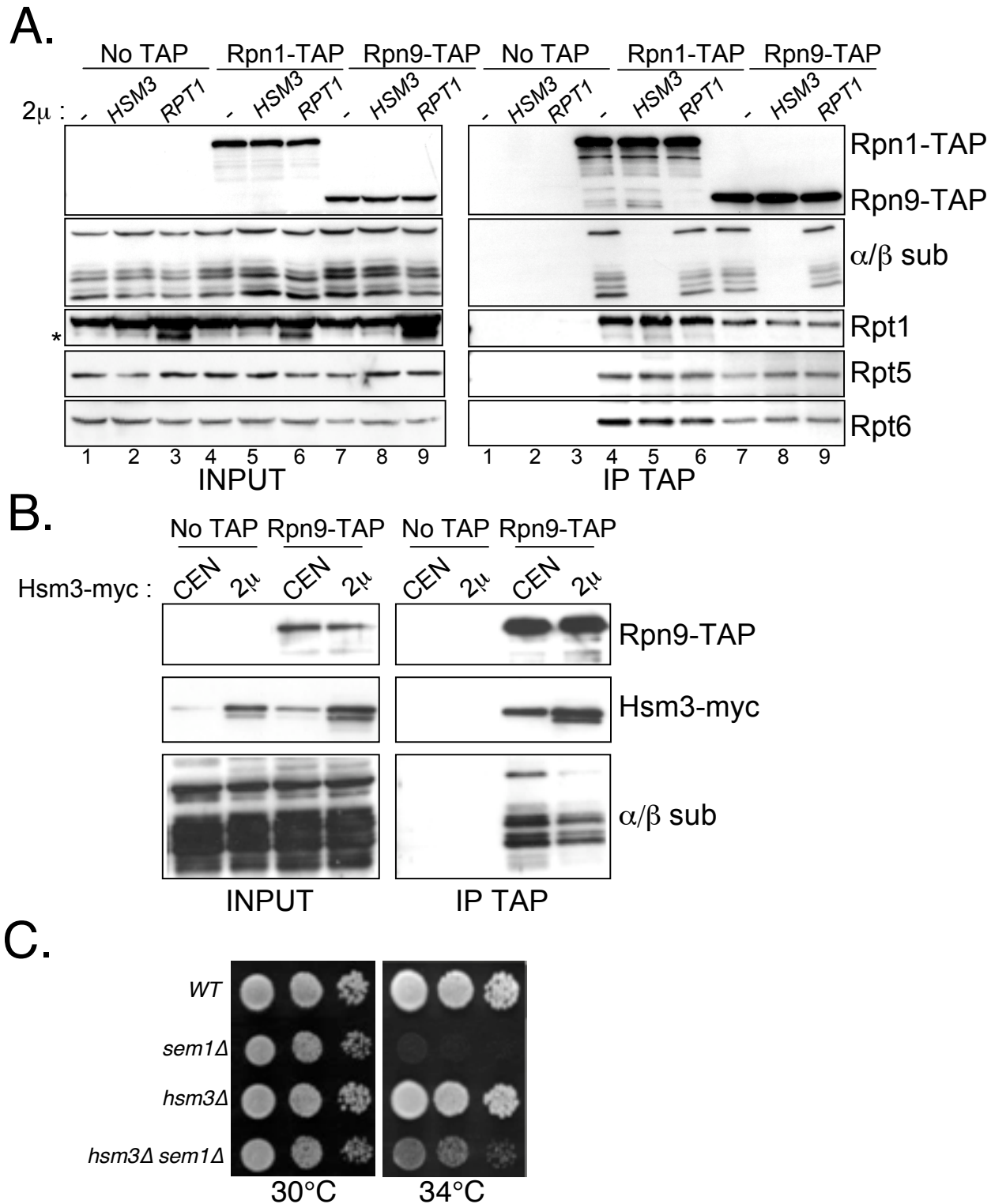


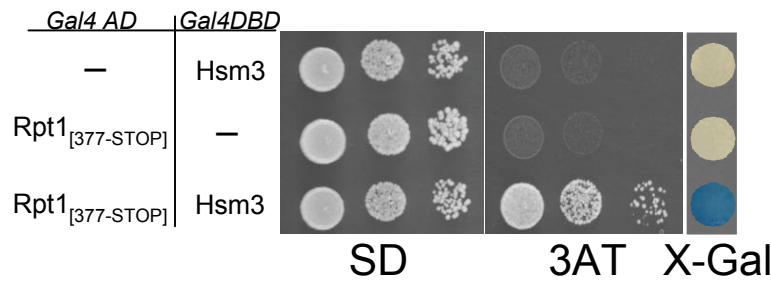
Figure 5. *Hsm3* regulates CP-RP association

A. Overexpression of *Hsm3* impairs CP-RP association. The different strains used in Fig 2B were transformed with a plasmid overexpressing (2 μ) either *HSM3* or *RPT1* or with the empty vector (-). IgG immunoprecipitations were then performed as described in Figure 2B. Co-immunoprecipitated proteins were evaluated by western blotting with appropriate antibodies as indicated on the right.

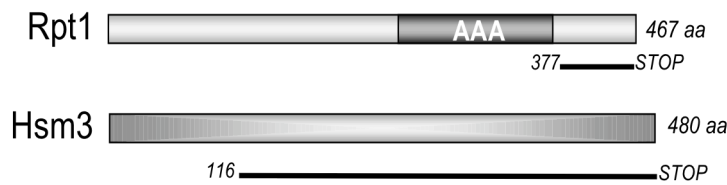
B. Association of *Hsm3* with the whole RP is sustained when *Hsm3* is overexpressed. CEN-based vector (CEN) or multicopy vector (2 μ) containing *myc4-HSM3* under its natural promoter was introduced into congenic *RPN9-TAP* or wild-type (No TAP) strains. Extracts were prepared and subjected to IgG pull-down assay. Lysates (INPUT) and immunoprecipitates (IP TAP) were analyzed by Western blotting with different antibodies raised against proteins as indicated on the right. 10 μ g of lysates and IP equivalent to 25 μ g of total proteins were analyzed for each strain.

C. Deletion of *HSM3* partially suppresses growth defects of *sem1* Δ mutant. Ten-fold serial dilutions of the indicated strains were spotted onto YPD plates and incubated at the indicated temperatures for 3 days.

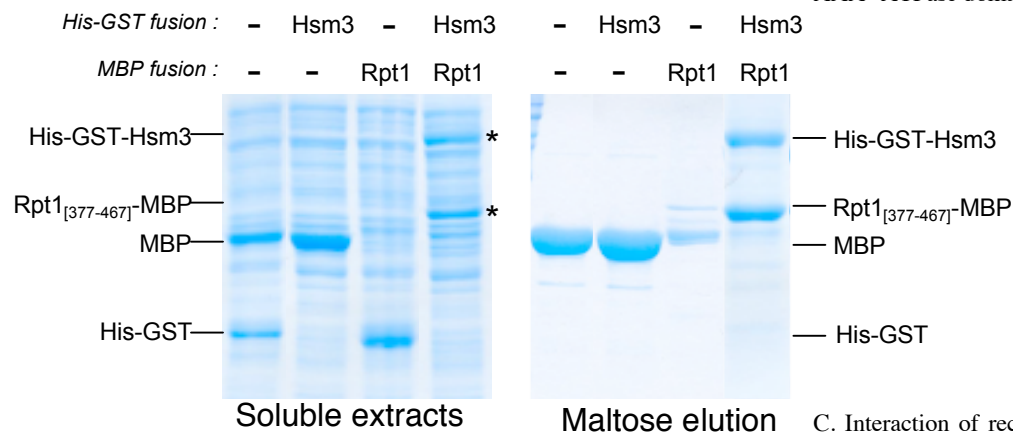
A.



B.



C.



D.

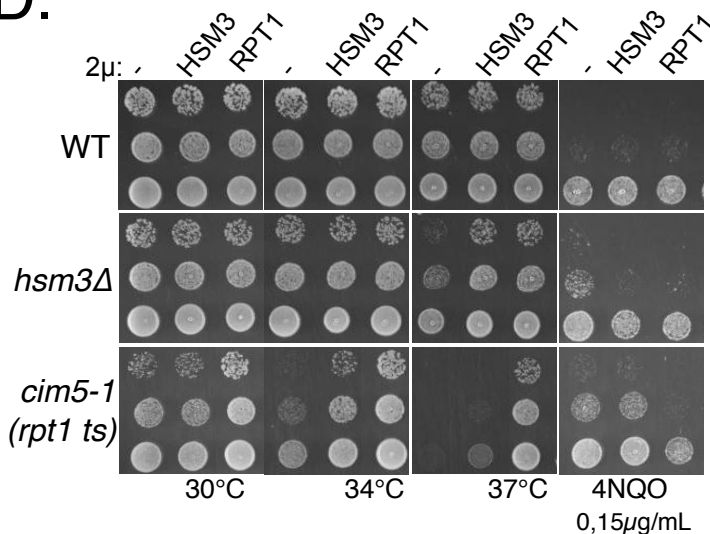


Figure 6. Hsm3 binds a C-terminal fragment of the Rpt1 AAA⁺ ATPase

A. *HSM3* was cloned into pGBT9 vector in frame with the Gal4DNA binding domain (GAL4DBD). The yeast strain Y187 was transformed with the resulting bait vector. Transformants were mated with the Y190 strain transformed with a genomic yeast library constructed in pACT2 Gal4 activating domain (Gal4AD) containing plasmid. Diploids were first selected for transcriptional activation of the *HIS3* reporter gene onto plates containing 3-Amino-Triazol (3AT). Blue color formation in presence of X-gal indicating transcriptional activation of the second reporter gene *LacZ* was then monitored. Most of the diploids in our screen contained fragments of Rpt1. The shortest fragment isolated corresponded to the last 90 amino acids of Rpt1 (Rpt1_[377-STOP]). Controls correspond to diploids containing either the bait and pACT2 vector or the prey and pGBT9 vector.

B. Schematic representation of Rpt1 and Hsm3 proteins highlighting the domains of each protein sufficient for promoting the interaction in the two-hybrid system. AAA indicates delimitations of AAA⁺ ATPase domain of Rpt1.

C. Interaction of recombinant Hsm3 and Rpt1_[377-STOP].

Left panel. Co-expression increases the solubility of His-GST-Hsm3 and Rpt1_[377-STOP]-MBP in *E. coli* cells. Solubility of individually expressed or co-expressed recombinant His-GST-Hsm3 (rHsm3) or Rpt1_[377-STOP]-MBP (rRpt1_[377-STOP]) proteins was analyzed. After SDS-PAGE, soluble proteins were stained with Coomassie. Asterisks indicate rHsm3 and rRpt1_[377-STOP]. Right panel : Co-purification of rHsm3/ rRpt1_[377-STOP]. Soluble fractions were loaded onto amylose resin. Bound proteins were eluted by adding maltose and the different fractions were analyzed by Coomassie staining.

D. Multicopy vector (2μ) containing *HSM3* or *RPT1* or no gene (-) was introduced into congenic *hsm3Δ*, *rpt1-ts* (*cim5-1*) or wild-type (WT) strains. Ten-fold serial dilutions of the transformants were spotted onto selective plates. Plates were incubated for 3 days at indicated temperatures. Plates containing 4NQO (0,15μg/mL) were incubated at 30°C.

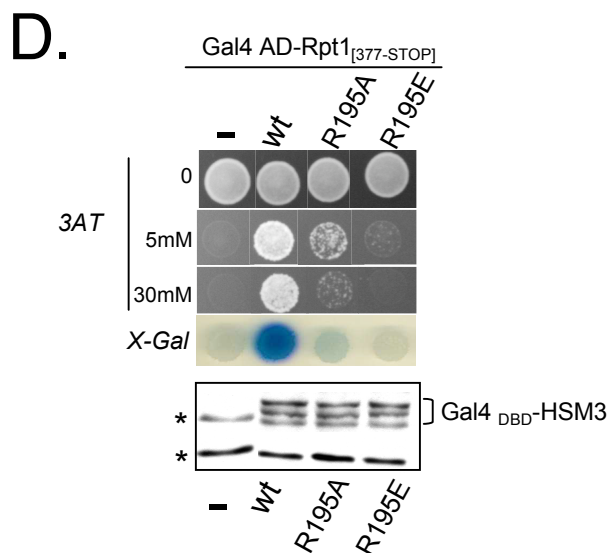
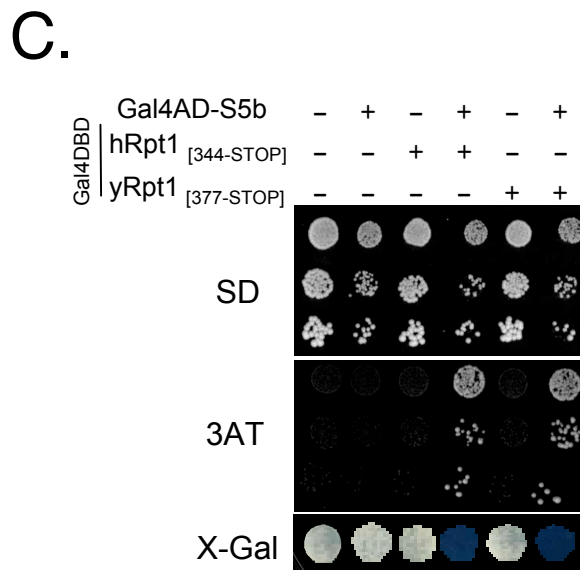
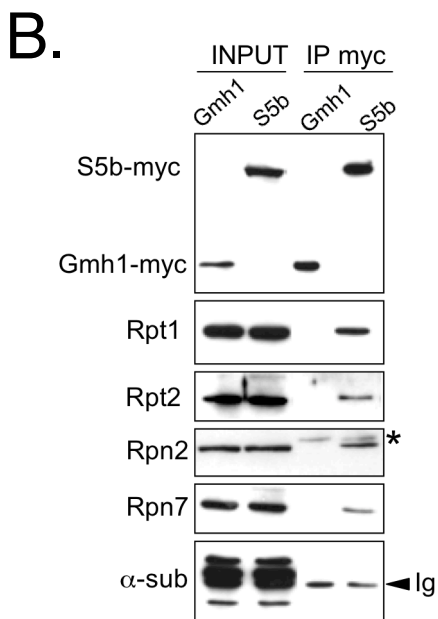
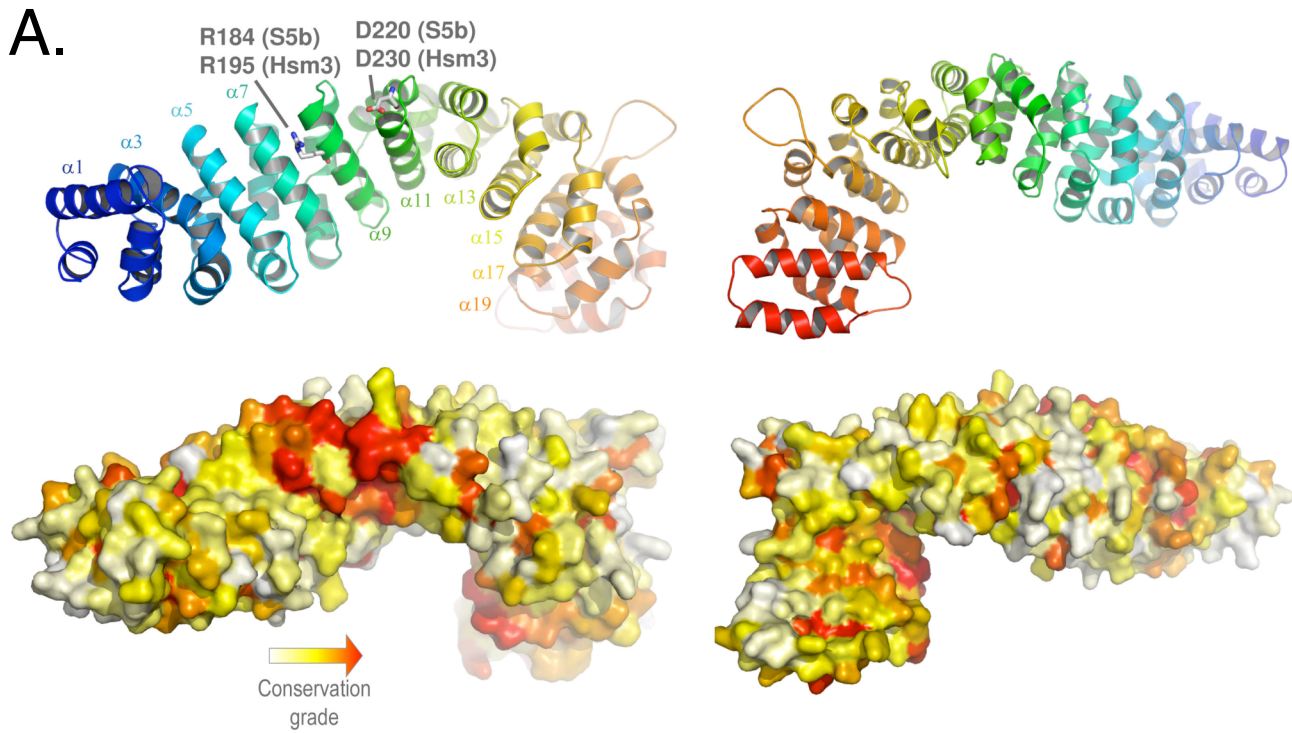


Figure 7. Hsm3 and the S5b mammalian protein are structurally and functionally related with each other

A. Structural model of S5b predicted from the template structure of the β -catenin shown as cartoon from blue to red for N- to C-terminal end and with odd-numbered α -helices labeled. Both invariant residues R184/D220 in human S5b and corresponding to R195/D230 in *S. cerevisiae* Hsm3 are shown in sticks and labeled. Below, a surface representation of the model is shown colored from white to red with respect to the conservation grade. The figure was drawn with PyMOL.

B. S5b co-immunoprecipitates with RP subunits. HEK293T cells were transfected with pcDNA3-3xmyc-S5b or with pcDNA3-3xmyc-Gmh1 (coding a non proteasomal protein) as a control. Extracts (INPUT) were immunoprecipitated with anti-Myc antibodies. The pellet fractions (IP Myc) were analyzed by Western blot using anti-Myc or antibodies raised against the different proteins indicated on the left. Ig, immunoglobulins. Asterisk indicate a non specific cross-reacting band.

C. The last 90 aminoacids of yeast Rpt1 (yRpt1_[377-STOP]) or the corresponding domain of human Rpt1 (hRpt1_[344-STOP]) were cloned into pGBT9 vector in frame with the Gal4DNA binding domain (GAL4DBD). pGBT9 was used as a negative control (GAL4DBD -). The different plasmids were used to transform Y187 strain. The transformants were mated with Y190 strain containing either pACT2 Gal4 activating domain (Gal4AD) containing vector (Gal4AD-S5b -) as negative control or pACT2-S5b corresponding to S5b cloned in frame with Gal4AD (Gal4AD-S5b +). Diploids were selected onto minimal medium (SD). Growth of serially diluted suspensions of cells plated in the presence of 3AT evaluates transcriptional activation of the *HIS3* reporter gene. Blue color formation in presence of X-gal indicates transcriptional activation of the second reporter gene *LacZ*.

D. Wild-type (wt) or mutant versions (R195A or R195E) of Hsm3 were cloned in frame with Gal4DBD in the pGBT9 vector and the resulting plasmids or the empty vector (-) were transformed in Y187 strain. The transformants were mated with Y190 strain containing Gal4AD-Rpt1_[377-STOP] corresponding to the C-terminal domain of yeast Rpt1 in frame with Gal4AD in the pACT2 vector. Equivalent suspensions of diploids cells were tested for growth in the presence of various concentrations of 3AT (0, 30 and 50mM) to evaluate the transcriptional activation of the *HIS3* reporter gene. Blue color formation in presence of X-Gal was also monitored to estimate the transcriptional activation of the *LACZ* reporter gene. Lower panel : Total extracts obtained from equal amounts of the different diploid cultures were subjected to western blotting using anti-Gal4DBD antibodies. Asterisks indicate non-relevant cross-reacting proteins and serve as loading control.

Supplemental data

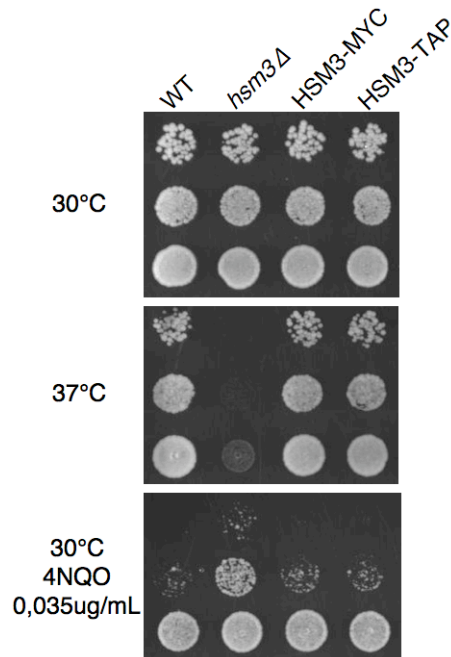


Figure S1. Functionality of epitope-tagged Hsm3 proteins in *S. cerevisiae*

Cultures were grown to mid-log phase, and normalized by cell density. 3 μ L drops of 10-fold serial dilutions of the indicated strains were plated onto YPD plates without drug or with 4NQO (0.035 μ g/mL). Plates were incubated at 37°C or at 30°C with or without 4NQO for 2 days. Note that in this background, the level of sensitivity of the wild-type strain towards 4NQO is higher than in BY4742 background.

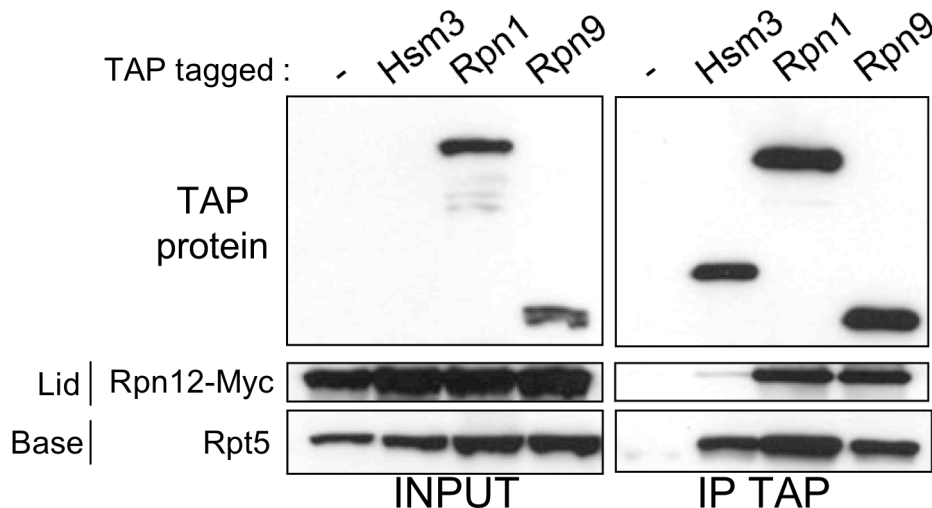


Figure S2. Hsm3-TAP co-immunoprecipitates efficiently the Rpt5 base subunit but not the Rpn12 lid subunit

Myc epitopes were added at the Rpn12 locus into different TAP-tagged strains. TAP-tagged proteins were immunoprecipitated as described in Experimental procedures. The eluates were then analyzed by immunoblotting using PAP reagent (TAP proteins) or anti-myc antibodies (Rpn12-myc) or anti-Rpt5 antibodies.

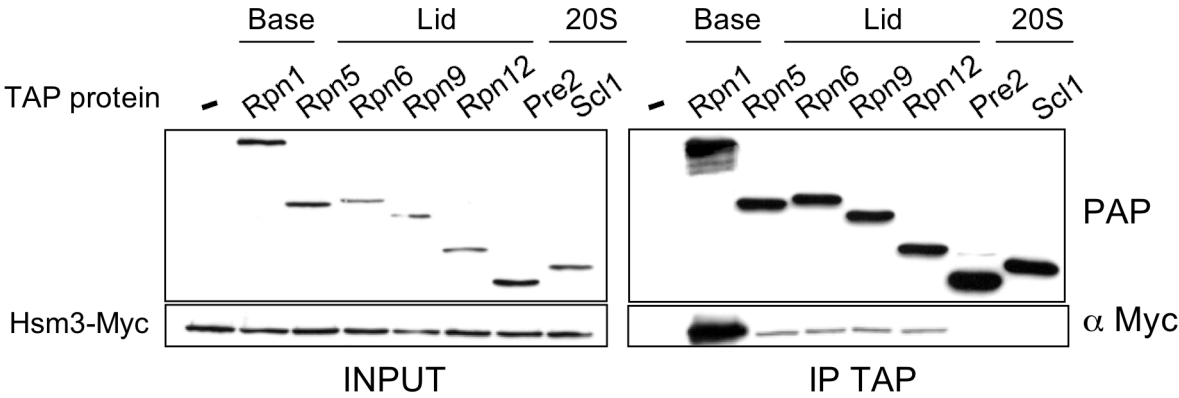


Figure S3. Hsm3-myc co-immunoprecipitates with base and lid subunits with various degrees of efficiency
TAP-tagged proteins were immunoprecipitated as described in Experimental procedures. The eluates were then analyzed by immunoblotting using PAP reagent to detect TAP-proteins and anti-Myc antibodies. In the conditions we used, CP-RP association is mostly preserved.

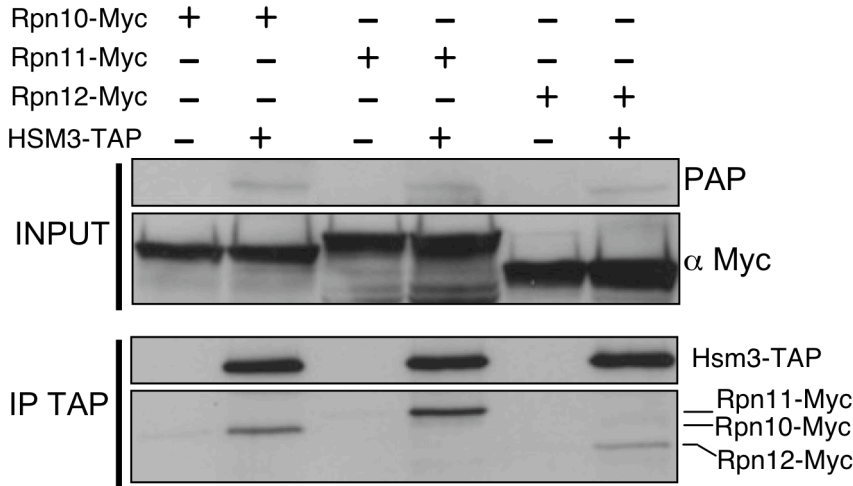


Figure S4. Co-immunoprecipitation of Hsm3-TAP with Rpn11 or Rpn12 lid subunits and base Rpn10 subunit
TAP-tagged Hsm3 was introduced into Rpn10 or Rpn11 or Rpn12 myc-tagged strains. Hsm3 was immunoprecipitated as described in Experimental procedures. Co-immunoprecipitation was then measured by immunoblotting using PAP complex to detect Hsm3-TAP and anti-Myc antibodies.

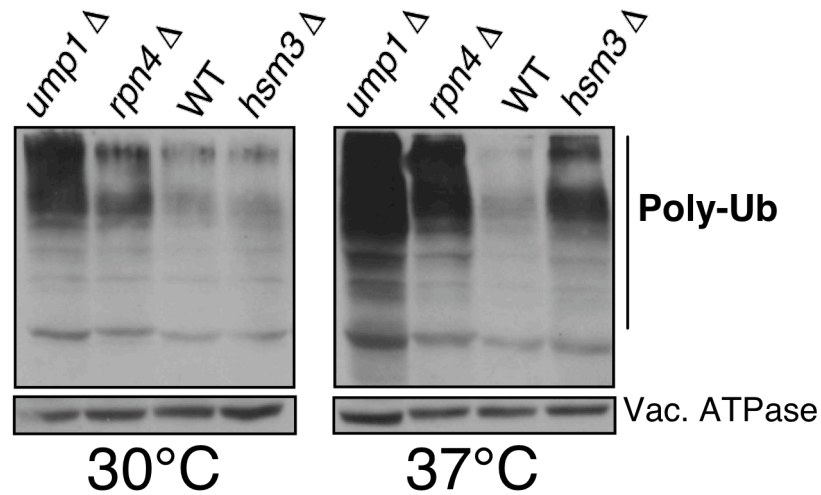


Figure S5. *hsm3*Δ cells accumulate high-molecular weight ubiquitin conjugates at 37°C
 Congenic strains were grown at 30°C and then shifted to 37°C for 6 hours. Levels of ubiquitin conjugates in crude extracts were analyzed by anti-polyubiquitin (Poly-Ub) western blot as indicated. Immunoblotting with anti-60kDa vacuolar ATPase (Vac. ATPase) was used as loading control.

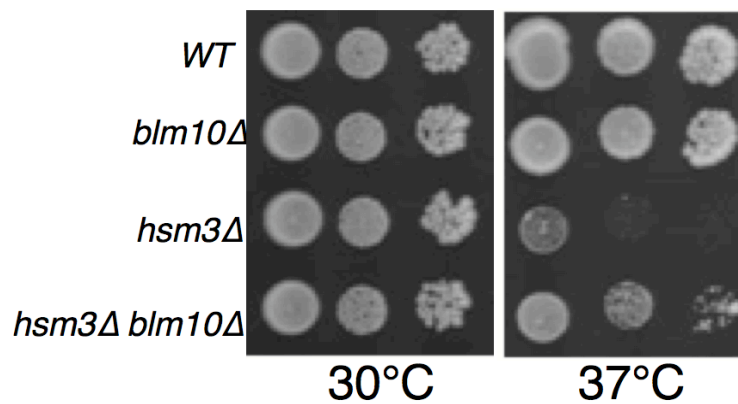


Figure S6. Deletion of *BLM10* partially suppresses growth defects of *hsm3*Δ mutant
 Ten-fold serial dilutions of the indicated strains were spotted onto YPD plates and incubated at the indicated temperatures for 3 days.

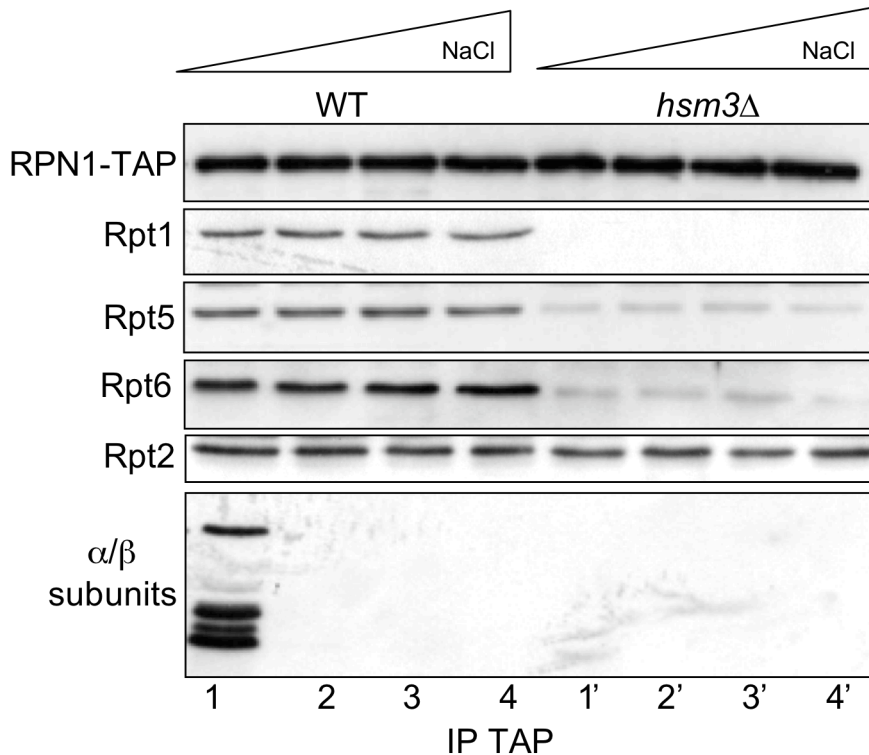


Figure S7. Salt resistant interactions within the base in the absence of Hsm3
Congenic strains were grown at 30°C and then shifted to 37°C for 6 hours. Crude extracts were prepared in the absence of NaCl and various amounts of NaCl were then added to obtain the required final concentrations (lanes 1 & 1' : 100mM, lanes 2 & 2' : 300mM, lanes 3 & 3' : 500mM, lanes 4 & 4' : 1M). TAP immunoprecipitation were then carried out with constant NaCl concentrations all along and analyzed as described in experimental procedures.

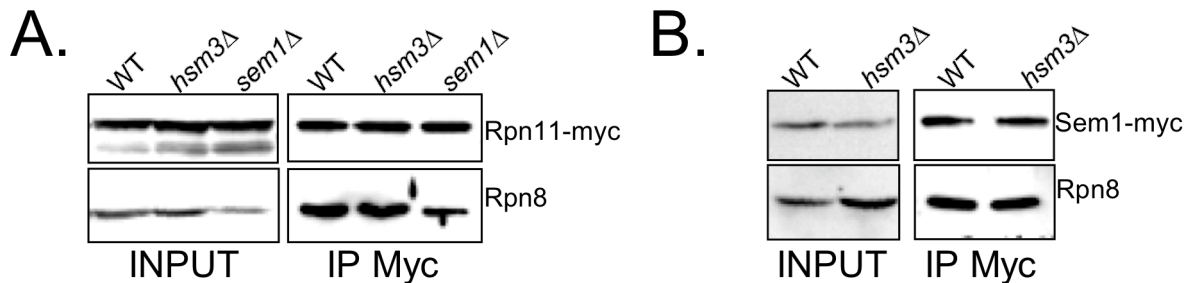


Figure S8. Interactions within the lid subcomplex are impaired in *sem1Δ* cells but not in *hsm3Δ* cells

A. Myc-tagged Rpn11 was introduced in wild-type, *hsm3Δ* or *sem1Δ* cells and was immunoprecipitated as described in Experimental procedures. The eluates were then analyzed by immunoblotting using anti-Rpn8 and anti-Myc antibodies. B. As in A, except that the protein used for immunoprecipitation is Myc-tagged Sem1.

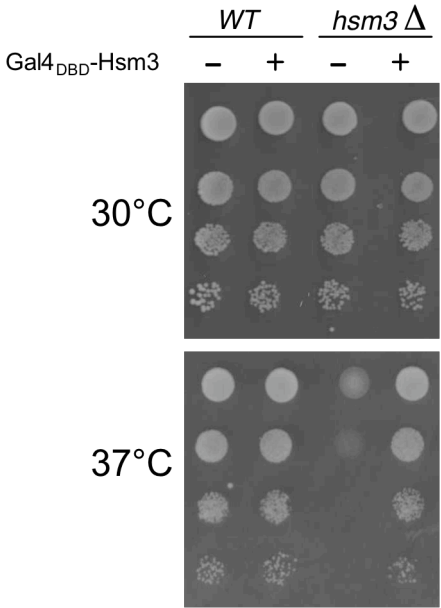


Figure S9. Functionality of the Hsm3 Gal4_{DBD} fusion protein in *S. cerevisiae*
Wild-type (WT) and *hsm3*Δ congenic strains were transformed with either pGBT9 (-) or pGBT9 containing HSM3 (+). Transformants were then grown to mid-log phase, and cultures normalized by cell density. 3 μL drops of 10-fold serial dilutions of the indicated strains were plated onto YPD plates. Plates were incubated at 37°C or at 30°C for 2 days.

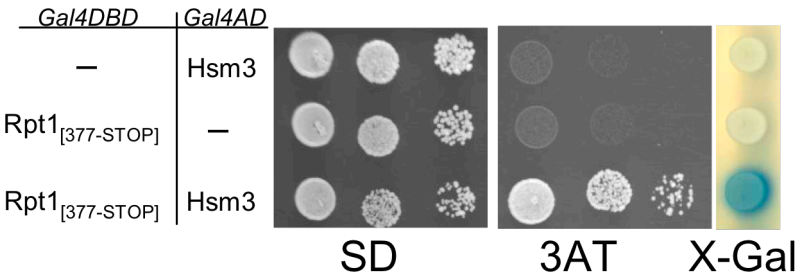


Figure S10. A carboxy-terminal domain of Rpt1 binds Hsm3
The last 90 aminoacids of yeast Rpt1 were cloned into pGBT9 vector in frame with the Gal4DNA binding domain

(GAL4DBD). The yeast strain Y190 was transformed with the resulting bait vector and mated with the Y187 strain transformed with the prey pACT2 vector containing *HSM3* ORF in frame with Gal4 DNA-activating domain (Gal4AD). Resulting diploids were selected onto appropriate plates (SD). Growth in presence of 3-Amino-Triazol (3AT) indicates transcriptional activation of the *HIS3* reporter gene. Blue color formation in presence of X-gal indicates transcriptional activation of the second reporter gene *LacZ*.

Figure S11 (next page)
Multiple sequence alignment of *S. cerevisiae* *HSM3* and human *S5B/PSMD5* homologs in 11 representative species preceded by the sequence “gi” number (nr database) represented using Jalview (Clamp et al., 2004). The initial alignment was built iteratively and comprised 43 sequences. Positions of the α-helices as predicted in the Arm/HEAT repeat model of human *S5B/PSMD5* are indicated as cartoons. Helices are drawn straight or broken depending on their predicted location at the concave or convex face of the fold, respectively. Red circles on top of the alignment columns indicated those positions significantly conserved as analyzed by the Rate4Site algorithm (see Experimental procedures).

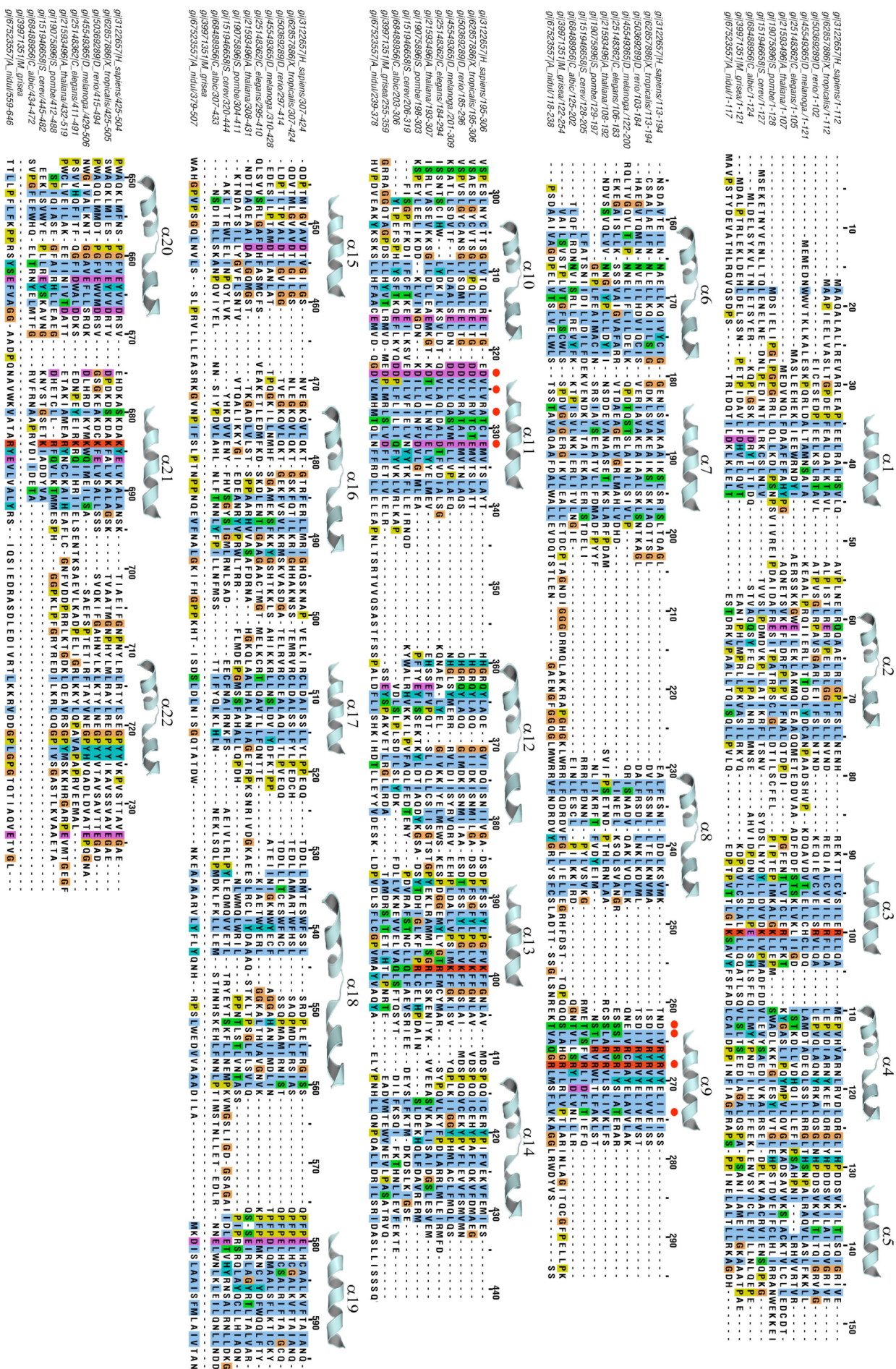


Table S1. Strains used in this study

Strain	Genotype	Reference
BLT12	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 trp1::Pα-NATMX4-TRP1-TetO</i>	Le Tallec et al, 2007
BLT15	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 trp1::Pα-NATMX4-TRP1-TetO-RAD53-GFP</i>	Le Tallec et al, 2007
BLT155	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 trp1::Pα-NATMX4-TRP1-TetO-RAD53-GFP sem1::KANMX4</i>	This study
BLT173	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 trp1::Pα-NATMX4-TRP1-TetO-RAD53-GFP hsm3::KANMX4</i>	This study
BLT174	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 trp1::Pα-NATMX4-TRP1-TetO-RAD53-GFP sem1::KANMX4 hsm3::HPHMX4</i>	This study
BLT63	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 poc3::HPHMX4</i>	Le Tallec et al, 2007
BLT65	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 sem1::HPHMX4</i>	This study
BLT67	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 ump1::HPHMX4</i>	Le Tallec et al, 2007
BLT68	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 poc1::HPHMX4</i>	Le Tallec et al, 2007
BLT82	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 PRE9-3HA-HIS3</i>	Le Tallec et al, 2007
BLT84	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 SEM1-3HA-HIS3</i>	Le Tallec et al, 2007
BLT87	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 POC4-13MYC-KANMX4</i>	Le Tallec et al, 2007
BLT91	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 PRE2-13MYC-KANMX4</i>	Le Tallec et al, 2007
BY4742	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i>	EUROSCARF
BY4741 <i>rpn4Δ</i>	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 rpn4::KANMX4</i>	EUROSCARF
BLT115	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 hsm3::HPHMX4</i>	This study
BLT116	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 poc1::HPHMX4 hsm3::KANMX4</i>	This study
CMY960	<i>MATα his3-11,15 leu2-3,112 ura3</i>	Le Tallec et al, 2007
CMY9603	<i>MATα his3-11,15 leu2-3,112 ura3 poc3::HPHMX4</i>	Le Tallec et al, 2007
BLT117	<i>MATα his3-11,15 leu2-3,112 ura3 hsm3::HPHMX4</i>	This study
BLT118	<i>MATα his3-11,15 leu2-3,112 ura3 sem1::HPHMX4</i>	This study
BLT119	<i>MATα his3-11,15 leu2-3,112 ura3 rpn10::KANMX4</i>	This study
BLT120	<i>MATα his3-11,15 leu2-3,112 ura3 blm10::KANMX4</i>	This study
BLT121	<i>MATα his3-11,15 leu2-3,112 ura3 poc1::KANMX4</i>	This study
BLT122	<i>MATα his3-11,15 leu2-3,112 ura3 rpn4::KANMX4</i>	This study
BLT123	<i>MATα his3-11,15 leu2-3,112 ura3 rpn10::KANMX4 hsm3::HPHMX4</i>	This study
BLT124	<i>MATα his3-11,15 leu2-3,112 ura3 HSM3-13MYC-KANMX4</i>	This study
BLT125	<i>MATα his3-11,15 leu2-3,112 ura3 RPN10-13MYC-KANMX4</i>	This study
BLT126	<i>MATα his3-11,15 leu2-3,112 ura3 HSM3-TAP-URA3</i>	This study
BLT127	<i>MATα his3-11,15 leu2-3,112 ura3 RPN1-TAP-URA3</i>	This study
BLT128	<i>MATα his3-11,15 leu2-3,112 ura3 RPN9-TAP-URA3</i>	This study
BLT129	<i>MATα his3-11,15 leu2-3,112 ura3 HSM3-TAP-URA3 SEM1-13MYC-KANMX4</i>	This study
BLT130	<i>MATα his3-11,15 leu2-3,112 ura3 RPN1-TAP-URA3 SEM1-13MYC-KANMX4</i>	This study
BLT131	<i>MATα his3-11,15 leu2-3,112 ura3 RPN9-TAP-URA3 SEM1-13MYC-KANMX4</i>	This study
BLT132	<i>MATα his3-11,15 leu2-3,112 ura3 SEM1-13MYC-KANMX4</i>	This study
BLT133	<i>MATα his3-11,15 leu2-3,112 ura3 RPN1-TAP-URA3 hsm3::KANMX4</i>	This study
BLT134	<i>MATα his3-11,15 leu2-3,112 ura3 RPN10-13MYC-KANMX4 hsm3::HPHMX4</i>	This study
BLT135	<i>MATα his3-11,15 leu2-3,112 ura3 SEM1-13MYC-KANMX4 hsm3::HPHMX4</i>	This study
BLT136	<i>MATα his3-11,15 leu2-3,112 ura3 RPN2-13MYC-KANMX4</i>	This study
BLT137	<i>MATα his3-11,15 leu2-3,112 ura3 RPN2-13MYC-KANMX4 hsm3::HPHMX4</i>	This study
BLT138	<i>MATα his3-11,15 leu2-3,112 ura3 RPN1-TAP-URA3 sem1::HPHMX4</i>	This study
BLT139	<i>MATα his3-11,15 leu2-3,112 ura3 PRE9-13MYC-KANMX4</i>	This study
BLT140	<i>MATα his3-11,15 leu2-3,112 ura3 PRE9-13MYC-KANMX4 hsm3::HPHMX4</i>	This study
BLT141	<i>MATα his3-11,15 leu2-3,112 ura3 PRE9-13MYC-KANMX4 sem1::HPHMX4</i>	This study
BLT142	<i>MATα his3-11,15 leu2-3,112 ura3 RPN12-13MYC-KANMX4</i>	This study
BLT143	<i>MATα his3-11,15 leu2-3,112 ura3 RPN12-13MYC-KANMX4 hsm3::HPHMX4</i>	This study
BLT144	<i>MATα his3-11,15 leu2-3,112 ura3 RPN12-13MYC-KANMX4 sem1::HPHMX4</i>	This study
BLT145	<i>MATα his3-11,15 leu2-3,112 ura3 hsm3::KANMX4 sem1::HPHMX4</i>	This study
BLT146	<i>MATα his3-11,15 leu2-3,112 ura3 blm10::KANMX4 hsm3::HPHMX4</i>	This study
BLT147	<i>MATα his3-11,15 leu2-3,112 ura3 RPN12-13MYC-KANMX4 HSM3-TAP-URA3</i>	This study
BLT148	<i>MATα his3-11,15 leu2-3,112 ura3 RPN12-13MYC-KANMX4 RPN1-TAP-URA3</i>	This study
BLT149	<i>MATα his3-11,15 leu2-3,112 ura3 RPN12-13MYC-KANMX4 RPN9-TAP-URA3</i>	This study
BLT150	<i>MATα his3-11,15 leu2-3,112 ura3 RPN11-13MYC-KANMX4</i>	This study
BLT160	<i>MATα his3-11,15 leu2-3,112 ura3 RPN10-13MYC-KANMX4 HSM3-TAP-URA3</i>	This study
BLT161	<i>MATα his3-11,15 leu2-3,112 ura3 RPN11-13MYC-KANMX4 HSM3-TAP-URA3</i>	This study
BLT162	<i>MATα his3-11,15 leu2-3,112 ura3 RPN11-13MYC-KANMX4 hsm3::HPHMX4</i>	This study
BLT163	<i>MATα his3-11,15 leu2-3,112 ura3 RPN11-13MYC-KANMX4 sem1::HPHMX4</i>	This study
Y253	<i>MATα ura3 lys2 ade2 his3 leu2</i>	Ghislain et al, 1993
Y806	<i>MATα ura3 lys2 ade2 his3 leu2 cim5-1</i>	Ghislain et al, 1993

Table S1. Strains used in this study (continued)

BLT164	<i>MATα ura3 lys2 ade2 his3 leu2 hsm3::HPHMX4</i>	This study
BLT165	<i>MATα ade2 arg4 leu2-3,112 trp1-289 ura3-52 HSM3-13MYC-KANMX4</i>	This study
BLT166	<i>MATα ade2 arg4 leu2-3,112 trp1-289 ura3-52 RPN1-TAP-URA3 HSM3-13MYC-KANMX4</i>	This study
BLT167	<i>MATα ade2 arg4 leu2-3,112 trp1-289 ura3-52 RPN5-TAP-URA3 HSM3-13MYC-KANMX4</i>	This study
BLT168	<i>MATα ade2 arg4 leu2-3,112 trp1-289 ura3-52 RPN6-TAP-URA3 HSM3-13MYC-KANMX4</i>	This study
BLT169	<i>MATα ade2 arg4 leu2-3,112 trp1-289 ura3-52 RPN9-TAP-URA3 HSM3-13MYC-KANMX4</i>	This study
BLT170	<i>MATα ade2 arg4 leu2-3,112 trp1-289 ura3-52 RPN12-TAP-URA3 HSM3-13MYC-KANMX4</i>	This study
BLT171	<i>MATα ade2 arg4 leu2-3,112 trp1-289 ura3-52 PRE2-TAP-URA3 HSM3-13MYC-KANMX4</i>	This study
BLT172	<i>MATα ade2 arg4 leu2-3,112 trp1-289 ura3-52 SCL1-TAP-URA3 HSM3-13MYC-KANMX4</i>	This study
Y187	<i>MATα ura3-52 his3-200 ade2-101 trp1-901 leu2-3,112 gal4Δ met- gal80Δ URA3::GAL1UAS-GAL1TATA-lacZ</i>	Fromont-Racine et al, 1997
Y190	<i>MATα ura3-52 his3-200 lys2-801 ade2-101 trp1-901 leu2-3 gal4Δ gal80Δ cyhr2 LYS2::GAL1UAS-HIS3TATA-HIS3 URA3::GAL1UAS-GAL1TATA-lacZ</i>	Fromont-Racine et al, 1997

Deletions and epitope-coding segments were introduced as described in Longtine, M. S., McKenzie, A., 3rd, Demarini, D. J., Shah, N. G., Wach, A., Brachat, A., Philippsen, P., and Pringle, J. R. (1998). Yeast 14, 953-961 and Goldstein, A. L., and McCusker, J. H. (1999). Yeast 15, 1541-1553.

Supplemental experimental procedures

Yeast Genetic Methods

Standard yeast genetic techniques and media were used (Sherman, 1991). Yeast strains used in this study are listed in Table S1. To determine growth in various conditions, yeast strains were grown to $OD_{600} = 0.1-0.5$ before being plated at 10-fold serial dilutions on YPD medium with or without drugs. To minimize contextual variations, these experiments were carried out in three different genetic backgrounds. 4NQO was purchased from SIGMA-Aldrich. Doxycyclin was used at $5\mu\text{g/mL}$ in ethanol.

DNA manipulation

The methods for DNA engineering were essentially those described in (Sambrook et al., 1989). Full-length human S5b and Rpt1 cDNAs were obtained from Dr M. Rechsteiner and Dr. E. Rousseau respectively. pHP14 and pHP16 correspond to S5b and hRpt1 respectively, introduced into pcDNA3-myc3 to create an N-terminal 3xcMyc fusion under the pCMV promoter. Expression of myc-tagged Hsm3 from CEN or 2μ plasmids was obtained by introducing myc4-Hsm3 under its natural promoter into the CEN-based pRS316 plasmid or in the episomal pRS426 plasmid respectively. pFL44 2μ plasmids containing *RPT1* and *HSM3* genes correspond to genomic fragments comprising natural promoters and full-length ORF selected upon their capacity to fully complement *rpt1-ts* and *hsm3Δ* mutants respectively.

Sequences and details of constructions are available upon request.

Antibodies and Immunoblotting

Western blot analysis was performed as previously described (Le Tallec et al., 2007). The

primary antibodies used were the following : 9E10 anti-Myc (Santa Cruz), anti- α 6 subunits MCP20 (Biomol), anti-“core” subunits (PW 9355 ; Biomol), anti-Cim5 and anti-Cim3 (kind gifts from Carl Mann), anti-yRpt2 (PW 8160 ; Biomol), anti-yRpt3 (PW 8250 ; Biomol), anti-Rpt5 (PW 8245 ; Biomol), anti-yRpn2 (21638 ; Abcam), anti S5a/Rpn10 (56851 ; Abcam). HRP-conjugated anti-rabbit or anti-mouse (Promega) were used as secondary antibodies. Detection was performed with ECL chemiluminescent reagents (Amersham Pharmacia).

Accumulation of Polyubiquitinated Proteins

Wild type and mutant strains were grown to $OD_{600}=1$ in YPD at 30°C or at 37°C for 6 hours. Cells were harvested and lysed into ethanol containing 50mM N-ethylmaleimide with glass beads as described in (Laney and Hochstrasser, 2002). Extracts were subjected to SDS-PAGE and analysed by Western blot using anti-ubiquitin-protein conjugates (Biomol) and anti-vacuolar ATPase 60kDa (Molecular Probes).

Supplemental references

- Clamp, M., Cuff, J., Searle, S.M., and Barton, G.J. (2004). The Jalview Java alignment editor. *Bioinformatics* 20, 426-427.
- Laney, J.D., and Hochstrasser, M. (2002). Assaying protein ubiquitination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol* 351, 248-257.
- Le Tallec, B., Barrault, M.B., Courbeyrette, R., Guerois, R., Marsolier-Kergoat, M.C., and Peyroche, A. (2007). 20S proteasome assembly is orchestrated by two distinct pairs of chaperones in yeast and in mammals. *Mol Cell* 27, 660-674.
- Sambrook, J., Fritsch, E., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2nd ed. edn (Cold Spring Harbor, NY).
- Sherman, F. (1991). Getting started with yeast. *Methods Enzymol* 194, 3-21.

3^{ème} partie : Protéasome et réponse aux dommages de l'ADN

Les phénotypes de suppression de la toxicité de l'allèle *RAD53-DL* et de résistance au 4NQO, au MMS et à la camptothécine (CPT) partagés par les mutants du protéasome *sem1Δ*, *pre9Δ* et *ump1Δ* et les mutants *poc1Δ*, *poc2Δ*, *poc3Δ*, *poc4Δ* et *hsm3Δ* nous ont permis d'identifier 5 facteurs d'assemblage du protéasome 26S de la levure *S. cerevisiae*. Ces phénotypes suggèrent également que le protéasome est impliqué dans la voie de réponse aux dommages de l'ADN (DDR).

1. Des phénotypes liés au protéasome 26S ?

En plus des mutants ci-dessus, nous avons testé la sensibilité au stress génotoxique de mutants thermosensibles de plusieurs sous-unités essentielles du protéasome 20S (*β4/pre1-1*, *β1/pre3-1*, *β7/pre4-1*), et constaté que tous présentent également un phénotype d'hyper-résistance au 4NQO et à la CPT (données non présentées). Ce phénotype est donc partagé aussi bien par des mutants du 20S que des mutants de la base (*rpt1/cim5-1*, *rpt6/cim3-1*) ou du couvercle du 19S (*sem1Δ*), ou encore des mutants des facteurs d'assemblage du protéasome (depuis *ump1Δ* jusqu'à *hsm3Δ*). Il semble donc refléter une perturbation de la fonction du protéasome 26S plutôt que de l'un ou l'autre de ses sous-complexes. Il n'est toutefois pas impossible, compte tenu de l'étroite imbrication fonctionnelle des composants du 26S, que le phénotype observé soit spécifique du 20S ou du 19S (base et/ou couvercle), et qu'une mutation affectant le 19S rejaillisse sur le 20S et vice versa.

Marques *et al.* ont en effet suggéré que le 19S participe, avec Blm10, à la stabilisation des complexes précurseurs du 20S et à la promotion de leur maturation (Marques *et al.*, 2007). Ainsi, bien qu'une mutation de la sous-unité Rpn2, qui perturbe la formation de la RP, n'entraîne pas de défaut majeur de la maturation du 20S, une forte accumulation de la forme précurseur de $\beta 2$ /Pup1 est observée quand le mutant *rpn2* est associé à la délétion de *BLM10*. Des perturbations de la RP pourraient donc affecter (faiblement) l'assemblage du 20S.

De la même façon, Kusmierczyk *et al.* ont proposé que le 20S fonctionne comme un facteur d'assemblage de la RP *in vivo*, ayant observé en gel natif des particules 19S aberrantes dans les mutants *poc3Δ*, *poc4Δ*, *ump1Δ* ou *α3/pre9Δ* (Kusmierczyk *et al.*, 2008). On peut remarquer qu'il est en fait très difficile de distinguer dans ce cas entre assemblage et stabilité de la RP. Les défauts du 20S, et en particulier de l'anneau α dans les mutants *poc3Δ*, *poc4Δ* ou *α3/pre9Δ* pourraient en effet empêcher une association 19S/20S stable et favoriser la dissociation de la RP, ou au contraire induire une interaction illégitime entre un 20S défectueux et une RP en cours d'assemblage. Les résultats obtenus avec Hsm3 favorisent cette hypothèse : un des rôles d'Hsm3, en se liant à la queue C-terminale de Rpt1, est très probablement d'empêcher une association trop précoce entre le 20S et la base du 19S tant que ce dernier n'est pas correctement assemblé (le décrochage d'Hsm3 lors des étapes finales de maturation de la RP autorisant alors seulement l'interaction RP-CP). Qu'ils affectent son assemblage et/ou sa stabilité, il semble néanmoins que des défauts 20S-spécifiques puissent perturber la RP.

En conclusion, des défauts RP pourraient « mimer » des défauts CP, et réciproquement. Or, comme nous l'avons vu au cours de l'introduction, le protéasome 20S sous forme libre est capable de dégrader directement certaines protéines, et la RP (voire la base elle-même) exerce certaines fonctions indépendamment de l'activité protéolytique du protéasome

(particulièrement dans la transcription, la réparation de l'ADN ou le remodelage de la chromatine). Des processus tant 20S- que 19S-spécifiques sont donc susceptibles d'être à l'origine de la résistance à certains agents génotoxiques. 19S, 20S ou 26S, nous ne pouvons exclure aucune possibilité. Cependant, l'inactivation d'Ecm29, qui favorise l'association RP-CP et stabilise le 26S chez *S. cerevisiae* (Leggett et al, 2002; Kleijnen et al, 2007), confère une faible mais reproductible résistance au 4NQO (données non présentées), ce qui étaye l'hypothèse 26S. Nous avons également testé l'impact de l'absence de Rpn14 (l'homologue putatif chez *S. cerevisiae* de PAAF1 qui régule négativement l'association RP/CP chez les mammifères (Park et al, 2005)) et de Blm10 sur la sensibilité au stress génotoxique, mais des phénotypes indistinguables de ceux d'une souche sauvage ont été observés sur 4NQO (la souche *blm10Δ* semble toutefois légèrement résistante à la CPT) (données non présentées).

2. Rad53 et le protéasome

Pas moins de 8 mutants affectant le protéasome sont capables de supprimer la toxicité de *RAD53-DL*. Selon le principe du crible, le protéasome est donc potentiellement un régulateur positif ou une cible de Rad53. Il y a de cela 10 ans, un crible de surexpression visant à supprimer la létalité des mutants *rad53Δ* et *mec1Δ* avait identifié les gènes *RPT4* et *RPN8* en plus des gènes *RNR* (ces résultats seraient malgré tout à reproduire) (Desany et al, 1998). Serait-ce à dire que le protéasome fait partie des checkpoints de l'ADN ?

2.1 Rad53, une cible du protéasome ?

A l'heure actuelle, les liens entre les checkpoints de l'ADN et le système ubiquitine-protéasome sont assez, pour ne pas dire très, minces. Un certain nombre de protéines des checkpoints sont dégradées par le protéasome, parmi lesquelles, chez les mammifères, le gardien du génome p53 (pour une revue, (Bode & Dong, 2004)), la claspine (homologue de la protéine adaptatrice Mrc1 de *S. cerevisiae*) (pour une revue, (Gewurz & Harper, 2006)) ou la protéine kinase effectrice Chk1 (Zhang et al, 2005). Chez *S. cerevisiae*, la monoubiquitinylation de l'histone H2B sur la lysine 123 par le complexe Rad6/Bre1/Lge1 (Hwang et al, 2003) est nécessaire à la méthylation de la lysine 79 de l'histone H3 impliquée dans l'activation des checkpoints en réponse aux dommages de l'ADN (Giannattasio et al, 2005; Wysocki et al, 2005). Les sous-unités ATPases Rpt4 et Rpt6 de la base du 19S, dont le recrutement à la chromatine dépend de l'ubiquitinylation de H2B, jouent un rôle crucial pour connecter ces 2 modifications épigénétiques. Rpt4 et Rpt6 n'interagissant pas directement avec l'ubiquitine, leur recrutement à la chromatine reflète très probablement l'interaction au moins de la base du 19S avec Ub-H2B (*via* Rpn13 notamment). Ce rôle semble indépendant de l'activité protéolytique du protéasome (Ezhkova & Tansey, 2004).

Afin de déterminer si Rad53 est régulée par le protéasome, nous avons comparé en Western blot la quantité de protéine Rad53 ainsi que sa phosphorylation en présence de 4NQO, CPT et hydroxyurée dans une souche sauvage et dans différents mutants du protéasome. Aucune différence n'a été observée : ni accumulation de Rad53 (ce qui était attendu : une stabilisation de Rad53-DL serait difficilement compatible avec l'effet suppresseur observé), ni réduction de l'activation de Rad53 par les stress génotoxiques (données non présentées). Le protéasome ne semble donc pas en amont de Rad53 dans une hypothétique voie de signalisation commune. On peut alors envisager que le protéasome soit une cible, directe ou non, de Rad53.

2.2 Le protéasome, une cible de Rad53 ?

Plusieurs sous-unités du protéasome sont phosphorylées, au moins chez les mammifères, incluant $\alpha 3$, $\alpha 7$ et plusieurs Rpt (Yang et al, 1995; Mason et al, 1998; Rivett et al, 2001; Satoh et al, 2001). La phosphorylation de Rpt6 semble favoriser son interaction avec $\alpha 2$ et l'assemblage du 26S (Satoh et al, 2001), celle d' $\alpha 7$ augmenter l'incorporation d' $\alpha 7$ au sein du protéasome (Rivett et al, 2001). Le rôle de la phosphorylation des sous-unités ATPases (hormis Rpt6) demeure peu connu mais pourrait réguler leur activité (Mason et al, 1998). Il a aussi été suggéré que PAC1 est modifiée post-traductionnellement (Hirano et al, 2005). Les protéines kinases responsables des phosphorylations restent pour la plupart à identifier. Seule, la caséine kinase II a été impliquée (essentiellement *in vitro*) dans la phosphorylation d' $\alpha 7$ sur les sérines 243 et 250 (Castano et al, 1996). Récemment, une analyse protéomique des substrats d'ATM a identifié plusieurs protéines du système ubiquitine-protéasome (UPS), mais qui correspondent en fait exclusivement à des membres de la composante « ubiquitine » (des E3 et des déubiquitinas pour l'essentiel) (Mu et al, 2007).

Le protéasome est-il régulé par Rad53 ? La question reste entière. Des défauts du protéasome entraînent une résistance à certains agents génotoxiques. En d'autres termes, le protéasome semble être un régulateur *négatif* de la réponse à ces stress. La protéine Rad53 est au contraire un régulateur *positif* de la réponse au stress génotoxique ; son inactivation provoque une hypersensibilité aux dommages de l'ADN. On pourrait alors imaginer que Rad53 active le protéasome pour qu'il dégrade certaines protéines de la DDR afin de moduler leur action. Cette activation peut être soit directe (phosphorylation Rad53-dépendante des composants du protéasome), soit indirecte (phosphorylation Rad53-dépendante de substrats entraînant leur polyubiquitylation et leur ciblage au protéasome)¹⁷. Quoiqu'il en soit, la voie d'épistasie correspondante serait la suivante : Rad53 régule positivement le protéasome qui régule négativement la réponse aux dommages de l'ADN. Une telle voie rend caduque la réalisation de tests d'épistasie entre un mutant *rad53Δ* et un mutant du protéasome, par exemple *poc3Δ*, pour déterminer si la résistance au stress génotoxique dépend ou non de Rad53 : l'absence de Poc3 est suffisante pour conférer une résistance au 4NQO (on enlève un régulateur négatif, un « inhibiteur » de la réponse au 4NQO), que Rad53 soit présent ou non. Une souche *rad53Δ poc3Δ* sera donc nécessairement beaucoup plus résistante au 4NQO qu'une souche *rad53Δ*. Ceci n'exclut absolument pas que le protéasome soit réellement une cible de Rad53, mais ce test génétique ne peut pas apporter la réponse. Des approches biochimiques sont susceptibles d'éclairer les relations – si relations il y a – entre Rad53 et le protéasome. Nous pourrions comparer en gel à 2 dimensions (particulièrement adaptés à la détection de modifications post-traductionnelles des protéines) les profils de migration des sous-unités du protéasome dans des souches sauvage, *RAD53-DL* et *rad53Δ*, en absence ou en présence de stress génotoxique, ou encore tester si l'activité du protéasome est augmentée dans la souche *RAD53-DL* ou après induction de dommages de l'ADN (et ce de façon Rad53-dépendante). Bien sûr, compte tenu de l'imbrication des différentes voies de la réponse aux dommages de l'ADN, il n'est pas exclu que les liens entre le protéasome et Rad53 soient beaucoup moins évidents et que la suppression de *RAD53-DL* par les mutants du protéasome résulte d'un mécanisme indirect plus difficile à caractériser. Quand bien même cela ne suffirait pas à

¹⁷ L'interaction substrat-E3 est fréquemment régulée par des modifications covalentes incluant des événements de phosphorylation. Dans la grande majorité des cas, les substrats des complexes SCF sont recrutés après phosphorylation (Deshaies et al, 1999).

établir des liens entre Rad53 et le protéasome, comprendre pourquoi une perturbation de la fonction du protéasome conduit à mieux résister à certains stress génotoxiques est un objectif qui se suffit à lui-même.

3. Pourquoi tant de résistance ?

3.1 Moins de dommages de l'ADN?

Des défauts du protéasome ne semblent pas modifier l'activation de Rad53. Nous avons confirmé ce résultat en suivant la cinétique d'activation de Rad53 après traitement des cellules au 4NQO ou à la CPT ainsi que le niveau de phosphorylation de Rad53 en réponse à différentes concentrations de ces drogues. Dans les 2 cas, les résultats obtenus sont similaires dans une souche sauvage et dans les mutants du protéasome. Bien que décevante *a priori*, cette observation nous rassure cependant sur un point : il semble que la quantité de dommages induits par le 4NQO et la CPT (visualisée indirectement par la phosphorylation de Rad53) est la même dans les mutants du protéasome et dans la souche sauvage. Il n'était en effet pas à exclure que le spectaculaire phénotype de résistance aux stress génotoxiques 4NQO, CPT et MMS des mutants du protéasome soit simplement lié à un défaut de pénétration ou de métabolisation de la drogue empêchant l'induction de dommages de l'ADN. Par exemple, une stabilisation de protéines impliquées dans la résistance pléiotropique aux drogues (PDR, Pleiotropic Drug Resistance, qui regroupe des transporteurs de type ABC, ATP binding cassette, et des facteurs de transcription ; pour une revue (Jungwirth & Kuchler, 2006)) pourrait provoquer un tel phénotype. Des tests d'épistasie combinant les mutants *poc3Δ* avec différents mutants de gènes *PDR* ont également été réalisés (si la résistance passe par l'accumulation du PdrX, on devrait perdre cette résistance en absence de PdrX). Pour tous les gènes *PDR* testés, il est apparu que les souches *pdrxΔ poc3Δ* sont beaucoup plus résistantes au 4NQO et à la CPT que les souches *pdrxΔ*, indiquant que la résistance au 4NQO et à la CPT de *poc3Δ* ne dépend pas du gène *PDRX* en question (données non présentées). Sans être exhaustifs, ces tests renforcent l'hypothèse d'une meilleure prise en charge des dommages de l'ADN dans les mutants du protéasome plutôt que d'une moindre induction des dommages. La suppression de la toxicité de *RAD53-DL* nous rassurait déjà sur ce point : elle se déroule en absence de tout agent chimique.

3.2 Un ralentissement du cycle ?

Une autre hypothèse triviale pouvait expliquer le phénotype de résistance de nos mutants. Le protéasome est en effet un acteur central du contrôle du cycle cellulaire en dégradant de nombreux facteurs qui régulent la progression du cycle, comme les cyclines ou l'inhibiteur de l'anaphase Pds1. Ces substrats sont ciblés au protéasome par 2 complexes E3 ligases indispensables au bon déroulement du cycle cellulaire, APC/C et SCF (pour une revue, (Vodermaier, 2004)). Il a ainsi été montré pour plusieurs mutants du protéasome une accumulation des cellules à la transition G2/M, accumulation corrélée à des niveaux de cyclines mitotiques plus élevés que la normale, mais aussi en phase G1 (par exemple, (Ghislain et al, 1993; Rubin et al, 1998)). Ce ralentissement du cycle pourrait-il alors « renforcer » les arrêts induits par les checkpoints de l'ADN, et donner plus de temps à la cellule pour réparer ? Rappelons que les mutants *rpt1/cim5* et *rpt6/cim3*, qui ont justement été isolés d'après leur phénotype d'arrêt en G2/M (Ghislain et al, 1993), sont résistants au 4NQO

à température permissive. Pour répondre à cette question, nous avons suivi par cytométrie en flux la progression du cycle cellulaire de cellules sauvages ou *poc3Δ* préalablement synchronisées en phase G1 et traitées avec du 4NQO (cette synchronisation permet en plus de s'affranchir d'un éventuel biais d'induction différentielle des dommages selon la phase du cycle). En absence de stress, nous avons observé un enrichissement en phase G2 des mutants *poc3Δ*. Le 4NQO provoque un arrêt en G1 des cellules sauvages et *poc3Δ*. Nous avons alors observé que les cellules *poc3Δ* reprennent leur cycle au moins aussi rapidement que les cellules sauvages, et que la phase S qui s'ensuit est plus courte dans le mutant. Le taux de survie des cellules sauvages et *poc3Δ* a bien entendu était déterminé, et s'est révélé sans surprise supérieur pour *poc3Δ*. En parallèle, la cinétique de phosphorylation de Rad53 a été suivie, montrant une activation similaire dans les 2 souches ; par contre, l'inactivation de Rad53 semble plus précoce dans *poc3Δ*, en accord avec la reprise du cycle plus rapide observée dans cette souche (données non présentées). En conclusion, les mutants du protéasome ne passent pas plus de temps à mieux réparer les lésions ; au contraire, des défauts du protéasome permettent une prise en charge à la fois plus rapide et plus efficace des dommages de l'ADN.

3.3 Protéasome et systèmes de réparation de l'ADN

Le raisonnement le plus simple consiste évidemment à imaginer qu'une seule protéine, stabilisée dans les mutants du protéasome, est à l'origine des phénotypes de suppression de la toxicité de *RAD53-DL* et d'hyper-résistance à certains stress génotoxiques (la stabilisation de plusieurs protéines contribuant sélectivement à la réponse à un stress donné est malheureusement tout aussi envisageable). Que le niveau de résistance au 4NQO soit le reflet direct du degré de perturbation de l'assemblage du 20S est tout à fait cohérent avec cette hypothèse (Le Tallec et al, 2007) : plus le 20S est affecté, moins il est catalytiquement actif, plus le substrat est stabilisé et peut exercer sa bénéfique influence en présence des différents stress. L'inactivation de ce substrat permettrait alors d'abolir l'hyper-résistance des mutants du protéasome ainsi que la suppression de la toxicité de *RAD53-DL*. Au contraire, sa surexpression devrait conduire à une résistance au 4NQO, à la CPT et au MMS, et supprimer la toxicité de *RAD53-DL*. Or, plusieurs cribles génétiques visant à identifier des gènes dont la surexpression supprime la toxicité de *RAD53-DL* ont déjà été réalisés au laboratoire (MC. Marsolier-Kergoat, A. Peyroche, données non publiées). Nous avons donc systématiquement testé si la surexpression des supprimeurs multicopies identifiés lors de ces cribles conduit à une hyper-résistance au 4NQO et à la CPT. Malheureusement, aucun candidat sérieux n'a été révélé par cette approche. Certes, aucun crible n'est exhaustif, mais il est bien sûr aussi possible que des mécanismes différents soient à l'origine de la résistance au stress génotoxique et de la suppression de *RAD53-DL*. Il serait alors parfaitement envisageable de réaliser un crible à l'échelle du génome sélectionnant les gènes dont la surexpression confère une hyper-résistance au 4NQO. Le temps m'en a manqué au cours de ma thèse. En parallèle à nos travaux sur le protéasome, nous avons néanmoins essayé d'identifier ce(s) fameux substrat(s) par une approche plus sélective : établir une liste de candidats d'après les données bibliographiques, puis déterminer par des tests d'épistasie si leur inactivation supprime la résistance des mutants du protéasome (ie si un double-mutant *substratΔ protéasomeΔ* se comporte comme un mutant *substratΔ* en présence de 4NQO ou de CPT). Ce substrat semble permettre une prise en charge plus efficace des dommages de l'ADN, qui aboutit à une

inactivation plus rapide des checkpoints et à la reprise du cycle cellulaire, suggérant une meilleure *réparation* de l'ADN. Nous nous sommes donc intéressés en premier lieu aux liens entre le protéasome, ou plus généralement l'UPS, et les systèmes de réparation de l'ADN chez *S. cerevisiae*.

3.3.1 Protéasome et réparation par excision de nucléotide

Le NER (Nucleotide Excision Repair) permet l'élimination de bases modifiées de l'ADN (dimères de thymine, (6-4)-photoproduits...) formées, par exemple, sous l'effet de radiations UV, en excisant un long fragment d'ADN de part et d'autre de la lésion (pour une revue, (Costa et al, 2003)). La fonction du protéasome dans le NER requiert l'interaction du 19S avec Rad23 (un composant du NER, qui est également un récepteur extrinsèque du protéasome aux protéines ubiquitinylées), et est indépendante de l'activité protéolytique du protéasome (Schauber et al, 1998; Russell et al, 1999; Gillette et al, 2001). Il a été supposé que la dégradation d'un autre composant du NER, Rad4, par le protéasome participe au NER, mais il semble en fait que l'ubiquitinylation de Rad4, et non sa protéolyse, est importante pour la réponse aux UV (Gillette et al, 2006). Un doute néanmoins quant à l'implication du NER dans la résistance des mutants du protéasome à plusieurs stress génotoxiques : le NER ne participe pas à la réparation des cassures double-brin de l'ADN. Ainsi, des mutants du NER présentent rigoureusement la même sensibilité à la CPT qu'une souche sauvage. Bien entendu, la résistance au 4NQO et à la CPT peut découler de mécanismes différents, mais... Il n'a donc pas été si surprenant de constater que des mutants déficients pour le NER (dont *rad23Δ*) survivent beaucoup mieux au 4NQO quand ils sont associés à une mutation *poc3Δ* (données non présentées).

3.3.2 Protéasome et recombinaison homologue

Chez *S. cerevisiae*, les cassures double-brin (CDB) de l'ADN sont très majoritairement réparées par recombinaison homologue (RH). Ce système de réparation fidèle utilise l'information génétique d'une molécule d'ADN identique pour réparer la molécule lésée, ce qui rend la présence de deux chromatides sœurs indispensable. La RH ne peut donc fonctionner qu'à partir de la phase S dans des cellules de levure haploïdes (Paques & Haber, 1999). Les mutants de la RH sont hyper-sensibles à un stress génotoxique tel que la CPT qui induit des CDB de l'ADN. Une partie des dommages engendrés par le MMS et le 4NQO sont également pris en charge par la recombinaison homologue.

L'implication du protéasome dans la RH coïncide avec l'identification en tant que sous-unité du couvercle du 19S de la protéine Sem1/DSS1 (Funakoshi et al, 2004; Krogan et al, 2004; Sone et al, 2004; Josse et al, 2006). Chez les mammifères, DSS1 s'associe physiquement avec BRCA2¹⁸ (Marston et al, 1999), une protéine impliquée dans la réparation de cassures double-brin par RH en association avec RAD51 (pour une revue sur BRCA2, (Gudmundsdottir & Ashworth, 2006)). DSS1 est essentielle à la fonction de BRCA2 (Yang et al, 2002; Kojic et al, 2003). Tout comme BRCA2, DSS1 est nécessaire à la formation de foyers de réparation nucléaire contenant RAD51 en réponse aux dommages de l'ADN ; une réduction de l'expression de DSS1 entraîne une instabilité génomique et une sensibilité aux agents génotoxiques (Gudmundsdottir et al, 2004). Les travaux de Krogan *et al.* chez *S. cerevisiae*

¹⁸ Bien qu'il existe une forte conservation de séquence entre les protéines Rad52 de la levure et RAD52 des eucaryotes supérieurs, BRCA2 semble être l'homologue fonctionnel de Rad52 chez les mammifères.

ont longtemps fait référence sur les liens entre le protéasome et la réparation des CDB (Krogan et al, 2004). Cette étude combine des analyses génétiques (sensibilité de mutants du protéasome, seuls ou combinés à des mutants de la réparation des CDB, à différents stress génotoxiques) et des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) visant à détecter la présence du protéasome au niveau d'une CDB spécifique induite par une endonucléase. Alors que les expériences de ChIP sont assez convaincantes et suggèrent que Sem1/DSS1, avec le 19S et le 20S, sont recrutés au niveau de la cassure, les résultats génétiques, entre autres, sont très discutables. Ainsi, certains double mutants sont d'abord présentés comme ayant un défaut synthétique de croissance, mais apparaissent ensuite pousser comme une souche sauvage pour mettre en exergue une (hypothétique) sensibilité à la CPT. Pour d'autres double mutants, le défaut de croissance synthétique annoncé est plus que léger. Un autre résultat est quant à lui parfaitement ininterprétable : selon Krogan *et al.*, la souche *sem1Δ* est incapable de pousser en présence d'une cassure double-brin induite par une endonucléase placée sous le contrôle d'un promoteur inductible par le galactose. Or, il manque un contrôle essentiel (impossibilité de coupure par l'endonucléase) permettant de s'affranchir d'un éventuel défaut de croissance des cellules *sem1Δ* en milieu galactose. Le modèle de Krogan *et al.* proposant que le protéasome est nécessaire à une réparation efficace des CDB est donc à considérer avec réserve.

Des études récentes réalisées chez les mammifères apparaissent néanmoins en accord avec ce modèle. Il a ainsi été montré que des inhibiteurs du protéasome réduisent l'efficacité de la réparation d'une CDB par recombinaison homologe. Cependant, le protéasome semble agir *avant* le complexe DSS1-BRCA2 dans la RH, ce qui complexifie un peu la vision de Krogan *et al.* et distingue la fonction protéolytique du protéasome de la fonction de DSS1 dans la RH (Murakawa et al, 2007). Un même mécanisme existe peut-être chez *S. cerevisiae*, qui demande à être dévoilé. Une étude précédente avait déjà séparé les fonctions protéolytiques du protéasome de celles de DSS1 dans la réponse aux dommages de l'ADN. Alors que des inhibiteurs du protéasome retardent la relocalisation sous forme de foyers nucléaires de plusieurs protéines de réparation de l'ADN en réponse aux radiations γ , la réduction de l'expression de DSS1 par des siRNA affecte spécifiquement la formation des foyers RAD51 (Jacquemont & Taniguchi, 2007). En montrant que l'activité protéolytique du protéasome est requise pour la réponse aux dommages de l'ADN, les études de Murakawa *et al.* et Jacquemont et Taniguchi pourraient par ailleurs expliquer les effets anti-tumoraux des inhibiteurs du protéasome *via* la sensibilisation des tumeurs aux traitements de radio- ou de chimiothérapie qui provoquent des dommages de l'ADN (Jacquemont & Taniguchi, 2007; Murakawa et al, 2007).

En conclusion, les données de la littérature suggèrent plutôt pour le protéasome un rôle de régulateur positif de la RH. Mais il est vrai aussi que les relations entre le protéasome et la réponse aux dommages de l'ADN sont complexes, et que l'influence de chaque type de mutant du protéasome sur chaque type de lésion doit être étudiée avec attention. Nous n'avons donc pas baissé les bras, et testé la dépendance de la résistance au 4NQO et à la CPT d'un mutant *poc3Δ* vis à vis de la recombinaison homologe. Nous avons alors constaté que la capacité d'une souche *poc3Δ* à survivre en présence de 4NQO ou de CPT dépend au moins partiellement de la RH. Des analyses par Western blot ont de plus révélé que la protéine Rad52, qui joue un rôle central dans la RH, s'accumule dans les mutants du protéasome, de façon qui plus est proportionnelle au niveau de résistance de la souche mutante.

L'accumulation de Rad52 est ainsi la plus importante dans la souche *ump1Δ* qui présente la plus forte résistance au 4NQO. La dégradation de Rad52 *via* l'UPS est peu documentée dans la littérature mais a déjà été suggérée (Sacher et al, 2006). Nous avons également suivi la relocalisation en foyers nucléaires de Rad52 après traitement au 4NQO, et observé un plus grand nombre de foyers Rad52 dans les cellules *poc3Δ* (données non présentées). Le gène *POC3* a par ailleurs été identifié par un autre laboratoire comme un mutant présentant une augmentation des foyers Rad52, et nommé *IRC25* (Increased recombination center) (Alvaro et al, 2007). Enfin, la suppression de la toxicité de *RAD53-DL* par *poc3Δ* semble dépendre elle aussi en partie de la recombinaison homologue (alors qu'elle ne dépend pas du NER) (données non présentées). Notre hypothèse de travail n'était peut-être pas si simpliste que cela. Mais nos résultats sont préliminaires et il convient de préciser les liens entre le protéasome et la RH chez *S. cerevisiae*, pour comprendre notamment les différences observées avec les résultats obtenus chez les mammifères. Il serait intéressant, par exemple, de comparer l'efficacité de la recombinaison homologue entre une souche sauvage et des mutants du protéasome à l'aide de substrats artificiels de la RH. Grâce à des expériences d'électrophorèse en champ pulsé, qui permettent de visualiser directement les chromosomes de levure et leur disparition après des cassures double-brins de l'ADN, on pourrait également mesurer la cinétique de réparation des CDB dans les différentes souches.

L'inactivation de la recombinaison homologue ne supprime pas complètement la résistance au 4NQO et à la CPT d'un mutant *poc3Δ*. Plusieurs substrats semblent donc concourir aux phénotypes des mutants du protéasome. La quête continue.

3.3.3 UPS et synthèse translésionnelle

Au cours de la dernière décennie ont été révélés de très nombreux rôles de l'ubiquitine dans la réponse aux dommages de l'ADN chez les eucaryotes. Mais, comme nous l'avons vu, qui dit ubiquitine ne dit plus nécessairement protéasome. La monoubiquitinylation et la polyubiquitinylation K63 des protéines, aux rôles non-protéolytiques, sont ainsi des signaux privilégiés au sein de la DDR (pour une revue, (Branzei & Foiani, 2008)). Le cas de PCNA est probablement l'un des mieux connus. Ce complexe trimérique encercle l'ADN et recrute les ADN polymérases au cours de la réplication. PCNA joue aussi un rôle crucial dans la réponse à certains dommages de l'ADN générés, par exemple, par les UV. Dans ce cas, PCNA est mono-ubiquitinylée au niveau de la lysine 164 par le complexe E2/E3 Rad6/Rad18 (Radiation sensitive), 2 protéines déjà connues pour leur importance dans la DDR (d'où leur nom). Cette modification de PCNA entraîne le recrutement de polymérases spécifiques appelées polymérases translésionnelles qui permettent de poursuivre la réplication de l'ADN malgré la lésion. Ce mécanisme de tolérance de la lésion est propre à créer des mutations, d'où le nom de *bypass error-prone*. PCNA peut aussi être polyubiquitinylée grâce au complexe Rad5/Ubc13/Mms2 qui catalyse l'allongement de chaînes K63 à partir de l'ubiquitine conjuguée par Rad6/Rad18. La polyubiquitinylation K63 de PCNA est essentielle au *bypass error-free* (non-mutagène) de la lésion par opposition au mécanisme infidèle favorisé par sa monoubiquitinylation ; le type de modification de PCNA par l'ubiquitine semble directement contrôler le mode de prise en charge de la lésion. On peut remarquer qu'au cours de la phase S, une fraction de PCNA est modifiée par une protéine de type ubiquitine, SUMO, au niveau de 2 lysines, dont K164. La sumoylation de PCNA conduit au recrutement de l'hélicase Srs2 qui inhibe les activités de recombinaison au niveau des

fourches de réplication bloquées. SUMO est remplacée par l'ubiquitine en cas de dommages de l'ADN. Un dialogue fonctionnel contrôlé (pour une revue sur la synthèse translésionnelle et les modifications de PCNA, (Moldovan et al, 2007)).

Nous penchons plutôt vers un rôle du protéasome 26S – un rôle protéolytique – dans la résistance aux dommages et la suppression de *RAD53-DL*. Mais sait-on jamais ! Nous avons donc inactivé le gène *RAD6* dans des souches sauvage et *poc3Δ*, et comparé leur survie en présence de 4NQO. Les résultats obtenus sont surprenants : la résistance au 4NQO de *poc3Δ* semble dépendre partiellement de *RAD6* (données non présentées). Ces résultats sont à rapprocher de ceux obtenus par McIntyre *et al.* qui ont analysé le spectre de mutations spontanées d'un mutant *ump1Δ* et montré qu'il était similaire à celui du mutant *mms2Δ* (McIntyre et al, 2007). De plus, cet effet mutateur dépend de *RAD6* (McIntyre et al, 2006), et il a récemment été montré que la polymérase translésionnelle pol η est stabilisée dans le mutant *ump1Δ* (Skoneczna et al, 2007). L'ensemble de ces données font étrangement écho aux travaux de Chabes *et al.* qui ont établi que l'hyper-résistance au stress génotoxique liée à l'augmentation des niveaux de dNTP s'accompagne d'un taux plus élevé de mutations, et ont proposé qu'une concentration accrue en dNTP pourrait augmenter l'action des polymérases translésionnelles, qui favorisent la survie de la cellule au détriment de la fidélité de la réparation (Chabes et al, 2003). Une stabilisation des polymérases translésionnelles elles-mêmes dans les mutants du protéasome pourrait provoquer les mêmes effets. Une éventuelle stabilisation de la ribonucléotide réductase dans les mutants du protéasome n'est pas non plus à exclure, mais reste à démontrer. Elle est malgré tout assez improbable : (i) une accumulation de la RNR devrait entraîner une résistance à l'hydroxyurée, ce que nous n'avons pas observé (au contraire, les mutants du protéasome semblent légèrement sensibles à l'hydroxyurée), (ii) la suractivation de la RNR apparaissant au moins partiellement responsable de la toxicité de *RAD53-DL*, sa stabilisation dans les mutants du protéasome serait difficilement compatible avec leur effet suppresseur.

Comme pour la recombinaison homologue, la dépendance de l'hyper-résistance au 4NQO vis à vis de la synthèse translésionnelle n'est pas totale. En toute logique, nous avons donc testé si la résistance de *poc3Δ* au 4NQO est totalement abolie lorsque la recombinaison homologue ET la synthèse translésionnelle sont inactivées. Malheureusement, la réponse est non. Encore et toujours non (données non présentées). On pourrait cependant envisager qu'un facteur commun à la RH et à la synthèse translésionnelle soit stabilisé dans les mutants du protéasome : plusieurs travaux documentent en effet une interconnexion entre ces 2 voies (Gangavarapu et al, 2007; Santa Maria et al, 2007). Pol η , qui s'accumule dans le mutant *ump1Δ* (Skoneczna et al, 2007) et qui favorise la recombinaison homologue (du moins chez les mammifères, (Kawamoto et al, 2005; McIlwraith et al, 2005)) est un candidat de choix.

3.3.4 Réparation des mésappariements de bases et résistance aux dommages de l'ADN

Le système de réparation des mésappariements de bases (MMR, Mismatch Repair) permet de corriger la plupart des erreurs de réplication de l'ADN. A notre connaissance, le MMR et le protéasome n'ont jamais été rapprochés l'un de l'autre. Cependant, une caractéristique des cellules déficientes pour le MMR ne peut que retenir notre attention : leur résistance à certains agents génotoxiques (en particulier les agents alkylants). Il a en effet été montré que des mutations affectant des gènes du MMR sont à l'origine de la résistance de cellules tumorales

à des drogues utilisées en chimiothérapie (Koi et al, 1994). Chez *S. cerevisiae*, l'inactivation de gènes du MMR conduit à une résistance accrue aux agents anticancéreux cisplatine, carboplatine et doxorubicine (Durant et al, 1999). Plusieurs explications ont été avancées pour expliquer cette résistance, convergeant sur un rôle du MMR dans la détection des lésions et la promotion des arrêts du cycle cellulaire et de l'apoptose. Un affaiblissement de la DDR (et donc de l'apoptose) en absence du MMR serait ainsi à l'origine de l'hyper-résistance des cellules (pour une revue sur le MMR, (Li, 2008)). Le MMR est aussi connu pour son rôle de régulateur négatif de la recombinaison homologue (Datta et al, 1996), ce qui nous rappelle quelque chose...

Curieusement, une connexion assez floue a été établie entre *HSM3* et le MMR (Fedorova et al, 1998) avant d'être sérieusement remise en cause (Fedorova et al, 2000; Merker et al, 2000). La résistance au 4NQO du mutant *hsm3Δ* et les données présentées ci-dessus nous ont enjoint d'examiner la sensibilité des mutants du MMR au 4NQO et à la CPT. Tous les mutants du MMR testés présentant la même sensibilité au 4NQO et à la CPT qu'une souche sauvage, nous n'avons pas approfondi cette hypothèse (données non présentées).

L'analyse de la mutagenèse spontanée des souches *ump1Δ* « signe » la synthèse translésionnelle (voir ci-dessus), celle des souches *hsm3Δ* a d'abord renvoyé au MMR (Fedorova et al, 1998; Fedorova et al, 2000), des résultats débattus depuis (Merker et al, 2000; Fedorova et al, 2004). Au vu de ces divergences, il serait très certainement utile de tester par nous-mêmes la mutagenèse spontanée ou induite par des dommages de l'ADN dans les différents mutants du protéasome. Enfin, même s'ils sont contestables, les résultats de mutagenèse spontanée d'une souche *hsm3Δ* semblent dépendre de l'état physiologique des cellules, *ie* si les cellules sont en phase active de division ou si elles sont proches de l'état stationnaire (Fedorova et al, 1998; Fedorova et al, 2000; Fedorova et al, 2004). Or, chez *S. cerevisiae*, des niveaux plus élevés de protéasome sont détectés en phase stationnaire¹⁹, qui favorise de plus l'association du 19S et du 20S et les configurations RP₂-CP (Fujimuro et al, 1998). Comparer la mutagenèse des différents mutants du protéasome en phases exponentielle et stationnaire pourrait peut-être apporter des informations non négligeables.

3.3.5 Autres systèmes de réparation

Nous avons également testé la dépendance de la résistance au 4NQO et à la CPT des mutants du protéasome vis à vis d'autres systèmes de réparation de l'ADN, à savoir la réparation par excision de base (BER, Base Excision Repair), dont les mutants sont légèrement sensibles au 4NQO, ou le NHEJ – Non-Homologous End Joining, impliqué dans la réparation de cassures double-brin de l'ADN – sans trop d'espoirs. Qui n'ont donc pas été déçus par l'indépendance entre la voie du protéasome et ces 2 systèmes de réparation pour les phénotypes étudiés (données non présentées).

3.4 Autres hypothèses

Après ce tour d'horizon des systèmes de réparation, il resterait à déterminer si l'hyper-résistance des mutants du protéasome dépend, au moins pour partie, de protéines impliquées dans le remodelage de la chromatine (complexes de remodelage de la chromatine, enzymes de modification des histones, chaperons d'histones, voire les histones eux-mêmes), compte tenu des liens avérés entre la DDR et les modifications de la chromatine (pour une revue, (Downs

¹⁹ Ce qui n'indique pas nécessairement une plus grande activité du protéasome dans ces cellules...

et al, 2007), et de la relation privilégiée entre l'UPS et le remodelage de la chromatine *via* notamment l'ubiquitinylation des histones (pour une revue, (O'Connell & Harper, 2007)). Compte tenu des multiples fonctions exercées par le protéasome et l'UPS au sein de la cellule, d'autres pistes ne sont pas à négliger. Les activités protéolytiques (Morris et al, 2003; Gillette et al, 2004) et non-protéolytiques du protéasome (Swaffield et al, 1992; Ferdous et al, 2001; Gonzalez et al, 2002; Lee et al, 2005; Lassot et al, 2007) dans la transcription pourraient ainsi jouer un rôle dans la réponse transcriptionnelle aux dommages de l'ADN. Des expériences de puces à ADN en absence et en présence de 4NQO ou de CPT permettraient de visualiser l'impact des différents mutants du protéasome sur le transcriptome des cellules, et d'identifier potentiellement dès le niveau transcriptionnel les facteurs responsables de leur hyper-résistance (des résultats à croiser avec ceux de puces à ADN réalisées pour la souche *RAD53-DL*). L'ubiquitinylation puis la dégradation de l'ARN-polymérase II par le protéasome en réponse aux dommages de l'ADN, visant à limiter la transcription jusqu'à la réparation des lésions (Kleiman et al, 2005; Somesh et al, 2005), constitue une autre piste sérieuse à explorer.

Précisons enfin que la résistance des mutants du protéasome est indépendante de *DOA1*, qui code une protéine participant au recyclage des chaînes de polyubiquitine K48 afin de « fournir » en ubiquitine les enzymes de modification de PCNA et des histones H2B (Lis & Romesberg, 2006). *DOA1* faisait pourtant figure de bon candidat pour relier les différentes voies contrôlées par l'UPS en réponse aux dommages de l'ADN.

3.5 Sensibilité au stress génotoxique des mutants *rpn4Δ*

Les mutants du protéasome que nous étudions ne résistent qu'à certains stress génotoxiques ; d'autres mutants affectant le protéasome sont sensibles aux dommages de l'ADN. C'est le cas du mutant *rpn4Δ*. Chez *S. cerevisiae*, la protéine Rpn4 reconnaît la séquence PACE présente dans la région promotrice des gènes des sous-unités du protéasome 26S et active leur transcription (Mannhaupt et al, 1999; Xie & Varshavsky, 2001). Un motif PACE est également retrouvé dans le promoteur de *MAG1*, qui code une 3-méthyladénine glycosylase impliqué dans la réparation de l'ADN par excision de base (Jelinsky et al, 2000). En absence de Rpn4, l'induction de *MAG1* en réponse au MMS est abolie, tout comme celle du gène du NER *RAD23*, ce qui pourrait expliquer la sensibilité de *rpn4Δ* au MMS (Jelinsky et al, 2000).

4. Conclusion

Nous pensons que les phénotypes de suppression de *RAD53-DL* et d'hyper-résistance à certains stress génotoxiques des mutants *poc1Δ*, *poc2Δ*, *poc3Δ*, *poc4Δ*, *hsm3Δ*, *sem1Δ*, *pre9Δ*, *ump1Δ*, *rpt1/cim5-1*, *rpt6/cim3-1*, *β1/pre3-1*, *β4/pre1-1*, *β7/pre4-1* et *ecm29Δ* (i) impliquent le protéasome 26S (ii) dépendent d'une meilleure prise en charge des dommages de l'ADN. Les résultats (préliminaires) discutés ici suggèrent que, plutôt qu'un facteur unique, plusieurs protéines impliquées dans la prise en charge des dommages de l'ADN (parmi lesquelles Rad52 ou certaines polymérases translésionnelles) sont spécifiquement stabilisées dans les mutants du protéasome et contribuent à leur hyper-résistance au 4NQO et/ou à la CPT et/ou au MMS, ainsi qu'à la suppression de la toxicité de *RAD53-DL*.

Identifier ces facteurs par une approche sélective comme celle que nous avons adoptée est instructif mais fastidieux. Des méthodologies alternatives probablement plus judicieuses existent. Nous avons déjà mentionné la réalisation d'un crible sélectionnant les gènes dont la

surexpression confère une hyper-résistance au 4NQO. Il serait également intéressant d'aborder notre problème sous l'angle « ubiquitine ». En théorie, l'absence d'enzymes de conjugaison ou de liaison de l'ubiquitine ou, au contraire, la surexpression d'enzymes de déubiquitinylation devraient en effet mimer un défaut 26S. Le crible suppresseur de *RAD53-DL* que nous avons réalisé n'a isolé ni E2 ni E3 ; de même, les précédents cribles visant à identifier des gènes dont la surexpression supprime la toxicité de *RAD53-DL* n'ont révélé aucune déubiquitinase. Décevant, mais aucunement rédhibitoire. Le nombre d'E2 et d'E3 est conséquent chez *S. cerevisiae*, mais il reste raisonnable (11 E2 pour une trentaine d'E3). Il est donc tout à fait concevable de tester individuellement l'effet suppresseur de la délétion de chaque E2 et de chaque E3, ainsi que la résistance au 4NQO, à la CPT et au MMS. Si d'aventure un des mutants (surtout dans le cas d'un E3) présente un phénotype d'hyper-résistance aux stress génotoxiques et de suppression de *RAD53-DL*, le ou les substrats de cet E2 ou E3 constitueraient d'excellents candidats pour expliquer les phénotypes observés. Enfin, une approche de type protéomique (gel d'électrophorèse en 2 dimensions, comparaison de l'intensité des spots entre une souche sauvage et des mutants du protéasome, en absence ou en présence de stress génotoxiques, puis identification par spectrométrie de masse des spots candidats) est envisageable. Un projet en soi.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Conclusion et Perspectives

L'objectif premier de mes travaux de thèse était l'identification et la caractérisation de nouveaux partenaires de la protéine kinase Rad53 chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (tel était l'intitulé exact du sujet proposé par le laboratoire). Dans ce but, une approche génétique a été développée, utilisant un allèle dominant létal de *RAD53*, *RAD53-DL*. Rad53-DL se comporte comme une forme hyperactive de Rad53 et déclenche constitutivement des réponses cellulaires normalement induites par des dommages de l'ADN. Notre hypothèse était que la toxicité de *RAD53-DL* devrait être réduite en absence soit des protéines nécessaires à son activation, soit des cibles physiologiques de Rad53 suractivées par Rad53-DL. Nous avons donc recherché, parmi les 4600 gènes non-essentiels de *Saccharomyces cerevisiae*, ceux qui suppriment la toxicité de *RAD53-DL* lorsqu'ils sont inactivés. 110 gènes suppresseurs ont été isolés, dont *RAD9*, ce qui a validé notre approche et confirmé l'efficacité du crible.

En combinant des analyses bio-informatiques et génétiques, ces suppresseurs ont été classés en groupes fonctionnels. Un groupe a particulièrement retenu notre attention. Il est composé de huit gènes qui, lorsqu'ils sont inactivés, confèrent à la cellule une résistance à plusieurs stress génotoxiques. Trois de ces gènes codent des composants ou un chaperon du protéasome 26S, l'enzyme central du système de dégradation ubiquitine-dépendante des protéines. Le protéasome est une structure macromoléculaire extrêmement complexe dont l'assemblage comprend de nombreuses étapes ordonnées. Au moment du crible, un seul chaperon du protéasome était connu chez la levure, la protéine Ump1, impliquée dans les étapes finales de maturation de la partie catalytique du protéasome. Par des méthodes génétiques et biochimiques, nous avons caractérisé les cinq autres membres du groupe fonctionnel « protéasome », dont la fonction était jusqu'alors inconnue. Les gènes *YLR021W*, *YPL144W*, *YLR199C* et *YKL206C*, que nous avons baptisés *POC1-4* (pour Protéasome Chaperone), codent 4 protéines formant deux paires de chaperons (Poc1-Poc2 et Poc3-Poc4) agissant en amont de Ump1. Nous avons identifié les homologues humains de Poc1-4 et montré que ce mécanisme de contrôle de l'assemblage du protéasome est conservé au cours de l'évolution. *HSM3* code une protéine chaperonne du complexe régulateur du protéasome. Hsm3 interagit directement avec la sous-unité Rpt1 et assiste l'assemblage de la base du 19S. Son rôle est également de réguler la formation du protéasome 26S en empêchant l'association du 20S avec le 19S tant que ce dernier n'est pas correctement assemblé. Comme pour les 4 facteurs Poc, un homologue fonctionnel d'Hsm3 a été identifié chez les mammifères.

Le phénotype de résistance à certains stress génotoxiques que nous avons observé pour de très nombreux mutants du protéasome 26S est un outil particulièrement puissant pour isoler de nouveaux composants de la voie du protéasome. La génétique n'a pas dit son dernier mot, loin de là ! De nombreuses analyses phénotypiques à l'échelle du génome ont déjà été réalisées grâce aux banques de mutants disponibles pour *S. cerevisiae*. Reprendre et étendre ces analyses à la sensibilité au 4NQO, à la camptothécine et au MMS ne manquerait probablement pas d'identifier de nouveaux composants de la voie du protéasome. Les réseaux d'interaction physique des différentes sous-unités du protéasome établis grâce aux approches ciblées et aux cribles à haut-débit fournissent déjà un nombre appréciable de candidats à tester.

En plus de cribles génétiques, on pourrait assurément faire appel au phénotype de résistance au 4NQO des mutants du protéasome pour identifier des molécules chimiques affectant

l'assemblage ou l'activité du protéasome de *S. cerevisiae*. Compte tenu de l'extrême conservation du protéasome chez les eucaryotes, il est probable que l'effet de ces molécules soit similaire dans les cellules mammifères. La découverte de nouveaux inhibiteurs du protéasome, dont l'utilisation thérapeutique est prometteuse, est un objectif du laboratoire. Préciser les mécanismes d'assemblage du protéasome chez la levure et les mammifères en est évidemment un autre. Les fonctions de Poc1-4 semblent bien définies, mais plusieurs questions demeurent concernant Hsm3, en particulier quant à son mode de régulation. Des analyses structurales sont également à l'étude.

N'oublions pas Rad53. Ses liens avec le protéasome sont toujours à tisser, et il est crucial d'approfondir nos travaux sur les mécanismes à l'origine de l'hyper-résistance aux stress génotoxiques des mutants du protéasome. Mon royaume pour un substrat ! Enfin, notre crible a identifié 110 partenaires potentiels de Rad53. En soustrayant les 8 suppresseurs « protéasome », *RAD9* et les 4 suppresseurs qui ont été impliqués dans la réponse aux dommages de l'ADN depuis la réalisation du crible (*IES4*, *PAN2*, *LGE1* et *HOS2*), il reste encore 97 gènes à étudier. Du bonheur des cribles génétiques.

BIBLIOGRAPHIE

- Aboussekhra A, Vialard JE, Morrison DE, de la Torre-Ruiz MA, Cernakova L, Fabre F, Lowndes NF** (1996) A novel role for the budding yeast RAD9 checkpoint gene in DNA damage-dependent transcription. *EMBO J* **15**(15): 3912-3922
- Abraham RT** (2001) Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev* **15**(17): 2177-2196
- Achstetter T, Ehmann C, Osaki A, Wolf DH** (1984) Proteolysis in eukaryotic cells. Proteinase yscE, a new yeast peptidase. *J Biol Chem* **259**(21): 13344-13348
- Ackermann K, Waxmann A, Glover CV, Pyerin W** (2001) Genes targeted by protein kinase CK2: a genome-wide expression array analysis in yeast. *Mol Cell Biochem* **227**(1-2): 59-66
- Agarwal R, Tang Z, Yu H, Cohen-Fix O** (2003) Two distinct pathways for inhibiting pds1 ubiquitination in response to DNA damage. *J Biol Chem* **278**(45): 45027-45033
- Ahn K, Erlander M, Leturcq D, Peterson PA, Fruh K, Yang Y** (1996) In vivo characterization of the proteasome regulator PA28. *J Biol Chem* **271**(30): 18237-18242
- Alcasabas AA, Osborn AJ, Bachant J, Hu F, Werler PJ, Bousset K, Furuya K, Diffley JF, Carr AM, Elledge SJ** (2001) Mrc1 transduces signals of DNA replication stress to activate Rad53. *Nat Cell Biol* **3**(11): 958-965
- Alic N, Higgins VJ, Dawes IW** (2001) Identification of a *Saccharomyces cerevisiae* gene that is required for G1 arrest in response to the lipid oxidation product linoleic acid hydroperoxide. *Mol Biol Cell* **12**(6): 1801-1810
- Allen JB, Zhou Z, Siede W, Friedberg EC, Elledge SJ** (1994) The SAD1/RAD53 protein kinase controls multiple checkpoints and DNA damage-induced transcription in yeast. *Genes Dev* **8**(20): 2401-2415
- Alvaro D, Lisby M, Rothstein R** (2007) Genome-wide analysis of Rad52 foci reveals diverse mechanisms impacting recombination. *PLoS Genet* **3**(12): e228
- Amerik AY, Hochstrasser M** (2004) Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. *Biochim Biophys Acta* **1695**(1-3): 189-207
- Amerik AY, Nowak J, Swaminathan S, Hochstrasser M** (2000) The Doa4 deubiquitinating enzyme is functionally linked to the vacuolar protein-sorting and endocytic pathways. *Mol Biol Cell* **11**(10): 3365-3380
- Amrani N, Ganesan R, Kervestin S, Mangus DA, Ghosh S, Jacobson A** (2004) A faux 3'-UTR promotes aberrant termination and triggers nonsense-mediated mRNA decay. *Nature* **432**(7013): 112-118
- Amsterdam A, Pitzer F, Baumeister W** (1993) Changes in intracellular localization of proteasomes in immortalized ovarian granulosa cells during mitosis associated with a role in cell cycle control. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(1): 99-103

Archibald JM, Teh EM, Keeling PJ (2003) Novel ubiquitin fusion proteins: ribosomal protein P1 and actin. *J Mol Biol* **328**(4): 771-778

Arendt CS, Hochstrasser M (1999) Eukaryotic 20S proteasome catalytic subunit propeptides prevent active site inactivation by N-terminal acetylation and promote particle assembly. *EMBO J* **18**(13): 3575-3585

Arendt CS, Hochstrasser M (1997) Identification of the yeast 20S proteasome catalytic centers and subunit interactions required for active-site formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(14): 7156-7161

Arnason T, Ellison MJ (1994) Stress resistance in *Saccharomyces cerevisiae* is strongly correlated with assembly of a novel type of multiubiquitin chain. *Mol Cell Biol* **14**(12): 7876-7883

Arrigo AP, Tanaka K, Goldberg AL, Welch WJ (1988) Identity of the 19S 'prosome' particle with the large multifunctional protease complex of mammalian cells (the proteasome). *Nature* **331**(6152): 192-194

Azzalin CM, Lingner J (2006) The human RNA surveillance factor UPF1 is required for S phase progression and genome stability. *Curr Biol* **16**(4): 433-439

Babbitt SE, Kiss A, Deffenbaugh AE, Chang YH, Bailly E, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Buranda T, Sklar LA, Baumler J, Gogol E, Skowyra D (2005) ATP hydrolysis-dependent disassembly of the 26S proteasome is part of the catalytic cycle. *Cell* **121**(4): 553-565

Baboshina OV, Haas AL (1996) Novel multiubiquitin chain linkages catalyzed by the conjugating enzymes E2EPF and RAD6 are recognized by 26 S proteasome subunit 5. *J Biol Chem* **271**(5): 2823-2831

Bajorek M, Finley D, Glickman MH (2003) Proteasome disassembly and downregulation is correlated with viability during stationary phase. *Curr Biol* **13**(13): 1140-1144

Baker KE, Parker R (2004) Nonsense-mediated mRNA decay: terminating erroneous gene expression. *Curr Opin Cell Biol* **16**(3): 293-299

Baker RT, Board PG (1991) The human ubiquitin-52 amino acid fusion protein gene shares several structural features with mammalian ribosomal protein genes. *Nucleic Acids Res* **19**(5): 1035-1040

Bakkenist CJ, Kastan MB (2003) DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* **421**(6922): 499-506

Bartek J, Bartkova J, Lukas J (2007) DNA damage signalling guards against activated oncogenes and tumour progression. *Oncogene* **26**(56): 7773-7779

Bartek J, Lukas J (2003) Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cancer Cell* **3**(5): 421-429

Bartek J, Lukas J (2007) DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation. *Curr Opin Cell Biol* **19**(2): 238-245

Baumeister W, Walz J, Zuhl F, Seemuller E (1998) The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell* **92**(3): 367-380

Bell DW, Varley JM, Szydlo TE, Kang DH, Wahrer DC, Shannon KE, Lubratovich M, Verselis SJ, Isselbacher KJ, Fraumeni JF, Birch JM, Li FP, Garber JE, Haber DA (1999) Heterozygous germ line hCHK2 mutations in Li-Fraumeni syndrome. *Science* **286**(5449): 2528-2531

Bell SP, Dutta A (2002) DNA replication in eukaryotic cells. *Annu Rev Biochem* **71**: 333-374

Ben-Saadon R, Zaaroor D, Ziv T, Ciechanover A (2006) The polycomb protein Ring1B generates self atypical mixed ubiquitin chains required for its in vitro histone H2A ligase activity. *Mol Cell* **24**(5): 701-711

Benaroudj N, Goldberg AL (2000) PAN, the proteasome-activating nucleotidase from archaeobacteria, is a protein-unfolding molecular chaperone. *Nat Cell Biol* **2**(11): 833-839

Bergink S, Salomons FA, Hoogstraten D, Groothuis TA, de Waard H, Wu J, Yuan L, Citterio E, Houtsmuller AB, Neefjes J, Hoeijmakers JH, Vermeulen W, Dantuma NP (2006) DNA damage triggers nucleotide excision repair-dependent monoubiquitylation of histone H2A. *Genes Dev* **20**(10): 1343-1352

Birrell GW, Brown JA, Wu HI, Giaever G, Chu AM, Davis RW, Brown JM (2002) Transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to DNA-damaging agents does not identify the genes that protect against these agents. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(13): 8778-8783

Bishop AC, Ubersax JA, Petsch DT, Matheos DP, Gray NS, Blethrow J, Shimizu E, Tsien JZ, Schultz PG, Rose MD, Wood JL, Morgan DO, Shokat KM (2000) A chemical switch for inhibitor-sensitive alleles of any protein kinase. *Nature* **407**(6802): 395-401

Bode AM, Dong Z (2004) Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* **4**(10): 793-805

Boutet SC, Disatnik MH, Chan LS, Iori K, Rando TA (2007) Regulation of Pax3 by proteasomal degradation of monoubiquitinated protein in skeletal muscle progenitors. *Cell* **130**(2): 349-362

Branzei D, Foiani M (2008) Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(4): 297-308

Branzei D, Foiani M (2005) The DNA damage response during DNA replication. *Curr Opin Cell Biol* **17**(6): 568-575

Branzei D, Foiani M (2006) The Rad53 signal transduction pathway: Replication fork stabilization, DNA repair, and adaptation. *Exp Cell Res* **312**(14): 2654-2659

- Braun BC, Glickman M, Kraft R, Dahlmann B, Kloetzel PM, Finley D, Schmidt M** (1999) The base of the proteasome regulatory particle exhibits chaperone-like activity. *Nat Cell Biol* **1**(4): 221-226
- Brooks CL, Gu W** (2006) p53 ubiquitination: Mdm2 and beyond. *Mol Cell* **21**(3): 307-315
- Brune C, Munchel SE, Fischer N, Podtelejnikov AV, Weis K** (2005) Yeast poly(A)-binding protein Pab1 shuttles between the nucleus and the cytoplasm and functions in mRNA export. *RNA* **11**(4): 517-531
- Brush GS, Morrow DM, Hieter P, Kelly TJ** (1996) The ATM homologue MEC1 is required for phosphorylation of replication protein A in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(26): 15075-15080
- Burhans WC, Weinberger M, Marchetti MA, Ramachandran L, D'Urso G, Huberman JA** (2003) Apoptosis-like yeast cell death in response to DNA damage and replication defects. *Mutat Res* **532**(1-2): 227-243
- Burri L, Hockendorff J, Boehm U, Klamp T, Dohmen RJ, Levy F** (2000) Identification and characterization of a mammalian protein interacting with 20S proteasome precursors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(19): 10348-10353
- Cagney G, Uetz P, Fields S** (2001) Two-hybrid analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* 26S proteasome. *Physiol Genomics* **7**(1): 27-34
- Cascio P, Call M, Petre BM, Walz T, Goldberg AL** (2002) Properties of the hybrid form of the 26S proteasome containing both 19S and PA28 complexes. *EMBO J* **21**(11): 2636-2645
- Castano JG, Mahillo E, Arizti P, Arribas J** (1996) Phosphorylation of C8 and C9 subunits of the multicatalytic proteinase by casein kinase II and identification of the C8 phosphorylation sites by direct mutagenesis. *Biochemistry* **35**(12): 3782-3789
- Celeste A, Fernandez-Capetillo O, Kruhlak MJ, Pilch DR, Staudt DW, Lee A, Bonner RF, Bonner WM, Nussenzweig A** (2003) Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks. *Nat Cell Biol* **5**(7): 675-679
- Celeste A, Petersen S, Romanienko PJ, Fernandez-Capetillo O, Chen HT, Sedelnikova OA, Reina-San-Martin B, Coppola V, Meffre E, Difilippantonio MJ, Redon C, Pilch DR, Olaru A, Eckhaus M, Camerini-Otero RD, Tessarollo L, Livak F, Manova K, Bonner WM, Nussenzweig MC, Nussenzweig A** (2002) Genomic instability in mice lacking histone H2AX. *Science* **296**(5569): 922-927
- Cerundolo V, Kelly A, Elliott T, Trowsdale J, Townsend A** (1995) Genes encoded in the major histocompatibility complex affecting the generation of peptides for TAP transport. *Eur J Immunol* **25**(2): 554-562
- Cha RS, Kleckner N** (2002) ATR homolog Mec1 promotes fork progression, thus averting breaks in replication slow zones. *Science* **297**(5581): 602-606

- Chabes A, Georgieva B, Domkin V, Zhao X, Rothstein R, Thelander L** (2003) Survival of DNA damage in yeast directly depends on increased dNTP levels allowed by relaxed feedback inhibition of ribonucleotide reductase. *Cell* **112**(3): 391-401
- Chakraverty RK, Kearsey JM, Oakley TJ, Grenon M, de La Torre Ruiz MA, Lowndes NF, Hickson ID** (2001) Topoisomerase III acts upstream of Rad53p in the S-phase DNA damage checkpoint. *Mol Cell Biol* **21**(21): 7150-7162
- Chang M, Bellaoui M, Boone C, Brown GW** (2002) A genome-wide screen for methyl methanesulfonate-sensitive mutants reveals genes required for S phase progression in the presence of DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(26): 16934-16939
- Chau V, Tobias JW, Bachmair A, Marriott D, Ecker DJ, Varshavsky A** (1989) A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein. *Science* **243**(4898): 1576-1583
- Chen C, Huang C, Chen S, Liang J, Lin W, Ke G, Zhang H, Wang B, Huang J, Han Z, Ma L, Huo K, Yang X, Yang P, He F, Tao T** (2008) Subunit-subunit interactions in the human 26S proteasome. *Proteomics* **8**(3): 508-520
- Chen P, Hochstrasser M** (1996) Autocatalytic subunit processing couples active site formation in the 20S proteasome to completion of assembly. *Cell* **86**(6): 961-972
- Chen P, Hochstrasser M** (1995) Biogenesis, structure and function of the yeast 20S proteasome. *EMBO J* **14**(11): 2620-2630
- Chen SH, Smolka MB, Zhou H** (2007) Mechanism of Dun1 activation by Rad53 phosphorylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **282**(2): 986-995
- Ciechanover A, Elias S, Heller H, Hershko A** (1982) "Covalent affinity" purification of ubiquitin-activating enzyme. *J Biol Chem* **257**(5): 2537-2542
- Ciechanover A, Heller H, Elias S, Haas AL, Hershko A** (1980) ATP-dependent conjugation of reticulocyte proteins with the polypeptide required for protein degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**(3): 1365-1368
- Ciechanover A, Hod Y, Hershko A** (1978) A heat-stable polypeptide component of an ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **81**(4): 1100-1105
- Clerici M, Baldo V, Mantiero D, Lottersberger F, Lucchini G, Longhese MP** (2004) A Tel1/MRX-dependent checkpoint inhibits the metaphase-to-anaphase transition after UV irradiation in the absence of Mec1. *Mol Cell Biol* **24**(23): 10126-10144
- Cobb JA, Bjergbaek L, Shimada K, Frei C, Gasser SM** (2003) DNA polymerase stabilization at stalled replication forks requires Mec1 and the RecQ helicase Sgs1. *EMBO J* **22**(16): 4325-4336

Codon AC, Gasent-Ramirez JM, Benitez T (1995) Factors Which Affect the Frequency of Sporulation and Tetrad Formation in *Saccharomyces cerevisiae* Baker's Yeasts. *Appl Environ Microbiol* **61**(4): 1677

Cohen-Fix O, Koshland D (1997) The anaphase inhibitor of *Saccharomyces cerevisiae* Pds1p is a target of the DNA damage checkpoint pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(26): 14361-14366

Cohen-Fix O, Peters JM, Kirschner MW, Koshland D (1996) Anaphase initiation in *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by the APC-dependent degradation of the anaphase inhibitor Pds1p. *Genes Dev* **10**(24): 3081-3093

Collins GA, Tansey WP (2006) The proteasome: a utility tool for transcription? *Curr Opin Genet Dev* **16**(2): 197-202

Collins SR, Miller KM, Maas NL, Roguev A, Fillingham J, Chu CS, Schuldiner M, Gebbia M, Recht J, Shales M, Ding H, Xu H, Han J, Ingvarsdottir K, Cheng B, Andrews B, Boone C, Berger SL, Hieter P, Zhang Z, Brown GW, Ingles CJ, Emili A, Allis CD, Toczyski DP, Weissman JS, Greenblatt JF, Krogan NJ (2007) Functional dissection of protein complexes involved in yeast chromosome biology using a genetic interaction map. *Nature* **446**(7137): 806-810

Costa RM, Chigancas V, Galhardo Rda S, Carvalho H, Menck CF (2003) The eukaryotic nucleotide excision repair pathway. *Biochimie* **85**(11): 1083-1099

Coux O, Nothwang HG, Silva Pereira I, Recillas Targa F, Bey F, Scherrer K (1994) Phylogenetic relationships of the amino acid sequences of prosome (proteasome, MCP) subunits. *Mol Gen Genet* **245**(6): 769-780

Coux O, Tanaka K, Goldberg AL (1996) Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu Rev Biochem* **65**: 801-847

Crosas B, Hanna J, Kirkpatrick DS, Zhang DP, Tone Y, Hathaway NA, Buecker C, Leggett DS, Schmidt M, King RW, Gygi SP, Finley D (2006) Ubiquitin chains are remodeled at the proteasome by opposing ubiquitin ligase and deubiquitinating activities. *Cell* **127**(7): 1401-1413

Cross FR (1995) Starting the cell cycle: what's the point? *Curr Opin Cell Biol* **7**(6): 790-797

Cyr DM, Hohfeld J, Patterson C (2002) Protein quality control: U-box-containing E3 ubiquitin ligases join the fold. *Trends Biochem Sci* **27**(7): 368-375

Dantuma NP, Masucci MG (2002) Stabilization signals: a novel regulatory mechanism in the ubiquitin/proteasome system. *FEBS Lett* **529**(1): 22-26

Datta A, Adjiri A, New L, Crouse GF, Jinks Robertson S (1996) Mitotic crossovers between diverged sequences are regulated by mismatch repair proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **16**(3): 1085-1093

Davies KJ (2001) Degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome. *Biochimie* **83**(3-4): 301-310

Davy A, Bello P, Thierry-Mieg N, Vaglio P, Hitti J, Doucette-Stamm L, Thierry-Mieg D, Reboul J, Boulton S, Walhout AJ, Coux O, Vidal M (2001) A protein-protein interaction map of the *Caenorhabditis elegans* 26S proteasome. *EMBO Rep* **2**(9): 821-828

De Duve C, Gianetto R, Appelmans F, Wattiaux R (1953) Enzymic content of the mitochondria fraction. *Nature* **172**(4390): 1143-1144

de la Torre-Ruiz MA, Green CM, Lowndes NF (1998) RAD9 and RAD24 define two additive, interacting branches of the DNA damage checkpoint pathway in budding yeast normally required for Rad53 modification and activation. *EMBO J* **17**(9): 2687-2698

Demartino GN, Gillette TG (2007) Proteasomes: machines for all reasons. *Cell* **129**(4): 659-662

DeMartino GN, Moomaw CR, Zagnitko OP, Proske RJ, Chu-Ping M, Afendis SJ, Swaffield JC, Slaughter CA (1994) PA700, an ATP-dependent activator of the 20 S proteasome, is an ATPase containing multiple members of a nucleotide-binding protein family. *J Biol Chem* **269**(33): 20878-20884

Desany BA, Alcasabas AA, Bachant JB, Elledge SJ (1998) Recovery from DNA replicational stress is the essential function of the S-phase checkpoint pathway. *Genes Dev* **12**(18): 2956-2970

Deshaies RJ (1999) SCF and Cullin/Ring H2-based ubiquitin ligases. *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**: 435-467

Deshpande AM, Newlon CS (1996) DNA replication fork pause sites dependent on transcription. *Science* **272**(5264): 1030-1033

Deveraux Q, Jensen C, Rechsteiner M (1995a) Molecular cloning and expression of a 26 S protease subunit enriched in dileucine repeats. *J Biol Chem* **270**(40): 23726-23729

Deveraux Q, Ustrell V, Pickart C, Rechsteiner M (1994) A 26 S protease subunit that binds ubiquitin conjugates. *J Biol Chem* **269**(10): 7059-7061

Deveraux Q, van Nocker S, Mahaffey D, Vierstra R, Rechsteiner M (1995b) Inhibition of ubiquitin-mediated proteolysis by the Arabidopsis 26 S protease subunit S5a. *J Biol Chem* **270**(50): 29660-29663

Di Stefano DL, Wand AJ (1987) Two-dimensional ¹H NMR study of human ubiquitin: a main chain directed assignment and structure analysis. *Biochemistry* **26**(23): 7272-7281

Ditzel L, Huber R, Mann K, Heinemeyer W, Wolf DH, Groll M (1998) Conformational constraints for protein self-cleavage in the proteasome. *J Mol Biol* **279**(5): 1187-1191

Dmitrieva NI, Cai Q, Burg MB (2004) Cells adapted to high NaCl have many DNA breaks and impaired DNA repair both in cell culture and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(8): 2317-2322

Doherty K, Pramanik A, Pride L, Lukose J, Moore CW (2004) Expression of the expanded YFL007w ORF and assignment of the gene name BLM10. *Yeast* **21**(12): 1021-1023

Dohrmann PR, Oshiro G, Tecklenburg M, Sclafani RA (1999) RAD53 regulates DBF4 independently of checkpoint function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **151**(3): 965-977

Dohrmann PR, Sclafani RA (2006) Novel role for checkpoint Rad53 protein kinase in the initiation of chromosomal DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **174**(1): 87-99

Downs JA, Lowndes NF, Jackson SP (2000) A role for *Saccharomyces cerevisiae* histone H2A in DNA repair. *Nature* **408**(6815): 1001-1004

Downs JA, Nussenzweig MC, Nussenzweig A (2007) Chromatin dynamics and the preservation of genetic information. *Nature* **447**(7147): 951-958

Drews O, Zong C, Ping P (2007) Exploring proteasome complexes by proteomic approaches. *Proteomics* **7**(7): 1047-1058

Driscoll J, Goldberg AL (1990) The proteasome (multicatalytic protease) is a component of the 1500-kDa proteolytic complex which degrades ubiquitin-conjugated proteins. *J Biol Chem* **265**(9): 4789-4792

Dubiel W, Ferrell K, Rechsteiner M (1995) Subunits of the regulatory complex of the 26S protease. *Mol Biol Rep* **21**(1): 27-34

Duncker BP, Shimada K, Tsai-Pflugfelder M, Pasero P, Gasser SM (2002) An N-terminal domain of Dbf4p mediates interaction with both origin recognition complex (ORC) and Rad53p and can deregulate late origin firing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(25): 16087-16092

Dupre S, Urban-Grimal D, Haguenaue-Tsapis R (2004) Ubiquitin and endocytic internalization in yeast and animal cells. *Biochim Biophys Acta* **1695**(1-3): 89-111

Durant ST, Morris MM, Illand M, McKay HJ, McCormick C, Hirst GL, Borts RH, Brown R (1999) Dependence on RAD52 and RAD1 for anticancer drug resistance mediated by inactivation of mismatch repair genes. *Curr Biol* **9**(1): 51-54

Durocher D, Henckel J, Fersht AR, Jackson SP (1999) The FHA domain is a modular phosphopeptide recognition motif. *Mol Cell* **4**(3): 387-394

Durocher D, Jackson SP (2002) The FHA domain. *FEBS Lett* **513**(1): 58-66

Elledge SJ (1996) Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science* **274**(5293): 1664-1672

Elledge SJ, Zhou Z, Allen JB (1992) Ribonucleotide reductase: regulation, regulation, regulation. *Trends Biochem Sci* **17**(3): 119-123

Elledge SJ, Zhou Z, Allen JB, Navas TA (1993) DNA damage and cell cycle regulation of ribonucleotide reductase. *Bioessays* **15**(5): 333-339

Elsasser S, Finley D (2005) Delivery of ubiquitinated substrates to protein-unfolding machines. *Nat Cell Biol* **7**(8): 742-749

Elsasser S, Gali RR, Schwickart M, Larsen CN, Leggett DS, Muller B, Feng MT, Tubing F, Dittmar GA, Finley D (2002) Proteasome subunit Rpn1 binds ubiquitin-like protein domains. *Nat Cell Biol* **4**(9): 725-730

Emili A (1998) MEC1-dependent phosphorylation of Rad9p in response to DNA damage. *Mol Cell* **2**(2): 183-189

Emili A, Schieltz DM, Yates JR, 3rd, Hartwell LH (2001) Dynamic interaction of DNA damage checkpoint protein Rad53 with chromatin assembly factor Asf1. *Mol Cell* **7**(1): 13-20

Emori Y, Tsukahara T, Kawasaki H, Ishiura S, Sugita H, Suzuki K (1991) Molecular cloning and functional analysis of three subunits of yeast proteasome. *Mol Cell Biol* **11**(1): 344-353

Enenkel C, Lehmann A, Klotzel PM (1998) Subcellular distribution of proteasomes implicates a major location of protein degradation in the nuclear envelope-ER network in yeast. *EMBO J* **17**(21): 6144-6154

Engelhard VH (1994) Structure of peptides associated with MHC class I molecules. *Curr Opin Immunol* **6**(1): 13-23

Etlinger JD, Goldberg AL (1977) A soluble ATP-dependent proteolytic system responsible for the degradation of abnormal proteins in reticulocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**(1): 54-58

Evans T RE, Youngblom J, Distel D, Hunt T. (1983) Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* **33**(2): 389-396

Eytan E, Ganoth D, Armon T, Hershko A (1989) ATP-dependent incorporation of 20S protease into the 26S complex that degrades proteins conjugated to ubiquitin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(20): 7751-7755

Ezhkova E, Tansey WP (2004) Proteasomal ATPases link ubiquitylation of histone H2B to methylation of histone H3. *Mol Cell* **13**(3): 435-442

Falck J, Lukas C, Protopopova M, Lukas J, Selivanova G, Bartek J (2001) Functional impact of concomitant versus alternative defects in the Chk2-p53 tumour suppressor pathway. *Oncogene* **20**(39): 5503-5510

Falkenburg PE, Haass C, Kloetzel PM, Niedel B, Kopp F, Kuehn L, Dahlmann B (1988) Drosophila small cytoplasmic 19S ribonucleoprotein is homologous to the rat multicatalytic proteinase. *Nature* **331**(6152): 190-192

Fedorova IV, Gracheva LM, Kovaltzova SV, Evstuhina TA, Alekseev SY, Korolev VG (1998) The yeast HSM3 gene acts in one of the mismatch repair pathways. *Genetics* **148**(3): 963-973

Fedorova IV, Kovaltzova SV, Gracheva LM, Evstuhina TA, Korolev VG (2004) Requirement of HSM3 gene for spontaneous mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res* **554**(1-2): 67-75

Fedorova IV, Kovaltzova SV, Korolev VG (2000) The yeast HSM3 gene is involved in DNA mismatch repair in slowly dividing cells. *Genetics* **154**(1): 495-496

Fehlker M, Wendler P, Lehmann A, Enenkel C (2003) Blm3 is part of nascent proteasomes and is involved in a late stage of nuclear proteasome assembly. *EMBO Rep* **4**(10): 959-963

Ferdous A, Gonzalez F, Sun L, Kodadek T, Johnston SA (2001) The 19S regulatory particle of the proteasome is required for efficient transcription elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell* **7**(5): 981-991

Ferrell K, Wilkinson CR, Dubiel W, Gordon C (2000) Regulatory subunit interactions of the 26S proteasome, a complex problem. *Trends Biochem Sci* **25**(2): 83-88

Finley D, Bartel B, Varshavsky A (1989) The tails of ubiquitin precursors are ribosomal proteins whose fusion to ubiquitin facilitates ribosome biogenesis. *Nature* **338**(6214): 394-401

Finley D, Ciechanover A, Varshavsky A (1984) Thermolability of ubiquitin-activating enzyme from the mammalian cell cycle mutant ts85. *Cell* **37**(1): 43-55

Finley D, Ozkaynak E, Varshavsky A (1987) The yeast polyubiquitin gene is essential for resistance to high temperatures, starvation, and other stresses. *Cell* **48**(6): 1035-1046

Finley D, Sadis S, Monia BP, Boucher P, Ecker DJ, Crooke ST, Chau V (1994) Inhibition of proteolysis and cell cycle progression in a multiubiquitination-deficient yeast mutant. *Mol Cell Biol* **14**(8): 5501-5509

Finley D, Tanaka K, Mann C, Feldmann H, Hochstrasser M, Vierstra R, Johnston S, Hampton R, Haber J, McCusker J, Silver P, Frontali L, Thorsness P, Varshavsky A, Byers B, Madura K, Reed SI, Wolf D, Jentsch S, Sommer T, Baumeister W, Goldberg A, Fried V, Rubin DM, Toh-e A, et al. (1998) Unified nomenclature for subunits of the *Saccharomyces cerevisiae* proteasome regulatory particle. *Trends Biochem Sci* **23**(7): 244-245

Flick K, Ouni I, Wohlschlegel JA, Capati C, McDonald WH, Yates JR, Kaiser P (2004) Proteolysis-independent regulation of the transcription factor Met4 by a single Lys 48-linked ubiquitin chain. *Nat Cell Biol* **6**(7): 634-641

Flott S, Alabert C, Toh GW, Toth R, Sugawara N, Campbell DG, Haber JE, Pasero P, Rouse J (2007) Phosphorylation of Slx4 by Mec1 and Tel1 regulates the single-strand annealing mode of DNA repair in budding yeast. *Mol Cell Biol* **27**(18): 6433-6445

Forster A, Masters EI, Whitby FG, Robinson H, Hill CP (2005) The 1.9 Å structure of a proteasome-11S activator complex and implications for proteasome-PAN/PA700 interactions. *Mol Cell* **18**(5): 589-599

Forster A, Whitby FG, Hill CP (2003) The pore of activated 20S proteasomes has an ordered 7-fold symmetric conformation. *EMBO J* **22**(17): 4356-4364

Fraschini R, Formenti E, Lucchini G, Piatti S (1999) Budding yeast Bub2 is localized at spindle pole bodies and activates the mitotic checkpoint via a different pathway from Mad2. *J Cell Biol* **145**(5): 979-991

Frentzel S, Pesold-Hurt B, Seelig A, Klotzel PM (1994) 20 S proteasomes are assembled via distinct precursor complexes. Processing of LMP2 and LMP7 proproteins takes place in 13-16 S preproteasome complexes. *J Mol Biol* **236**(4): 975-981

Friedberg EC, Walker GC, Siede W (2005) DNA Repair and Mutagenesis, 2nd Ed. ASM Press, Washington, DC.

Fu H, Doelling JH, Arendt CS, Hochstrasser M, Vierstra RD (1998a) Molecular organization of the 20S proteasome gene family from *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **149**(2): 677-692

Fu H, Reis N, Lee Y, Glickman MH, Vierstra RD (2001) Subunit interaction maps for the regulatory particle of the 26S proteasome and the COP9 signalosome. *EMBO J* **20**(24): 7096-7107

Fu H, Sadis S, Rubin DM, Glickman M, van Nocker S, Finley D, Vierstra RD (1998b) Multiubiquitin chain binding and protein degradation are mediated by distinct domains within the 26 S proteasome subunit Mcl1. *J Biol Chem* **273**(4): 1970-1981

Fujimuro M, Takada H, Saeki Y, Toh-e A, Tanaka K, Yokosawa H (1998a) Growth-dependent change of the 26S proteasome in budding yeast. *Biochem Biophys Res Commun* **251**(3): 818-823

Fujimuro M, Tanaka K, Yokosawa H, Toh-e A (1998b) Son1p is a component of the 26S proteasome of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **423**(2): 149-154

Funakoshi M, Li X, Velichutina I, Hochstrasser M, Kobayashi H (2004) Sem1, the yeast ortholog of a human BRCA2-binding protein, is a component of the proteasome regulatory particle that enhances proteasome stability. *J Cell Sci* **117**(Pt 26): 6447-6454

Galgoczy DJ, Toczyski DP (2001) Checkpoint adaptation precedes spontaneous and damage-induced genomic instability in yeast. *Mol Cell Biol* **21**(5): 1710-1718

Gangavarapu V, Prakash S, Prakash L (2007) Requirement of RAD52 group genes for postreplication repair of UV-damaged DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **27**(21): 7758-7764

Ganoth D, Leshinsky E, Eytan E, Hershko A (1988) A multicomponent system that degrades proteins conjugated to ubiquitin. Resolution of factors and evidence for ATP-dependent complex formation. *J Biol Chem* **263**(25): 12412-12419

Gardner R, Putnam CW, Weinert T (1999) RAD53, DUN1 and PDS1 define two parallel G2/M checkpoint pathways in budding yeast. *EMBO J* **18**(11): 3173-3185

Gari E, Piedrafita L, Aldea M, Herrero E (1997) A set of vectors with a tetracycline-regulatable promoter system for modulated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**(9): 837-848

Gasch AP, Huang M, Metzner S, Botstein D, Elledge SJ, Brown PO (2001) Genomic expression responses to DNA-damaging agents and the regulatory role of the yeast ATR homolog Mec1p. *Mol Biol Cell* **12**(10): 2987-3003

Gasch AP, Spellman PT, Kao CM, Carmel-Harel O, Eisen MB, Storz G, Botstein D, Brown PO (2000) Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol Biol Cell* **11**(12): 4241-4257

Gautier J, Minshull J, Lohka M, Glotzer M, Hunt T, Maller JL (1990) Cyclin is a component of maturation-promoting factor from *Xenopus*. *Cell* **60**(3): 487-494

Gautier J, Norbury C, Lohka M, Nurse P, Maller J (1988) Purified maturation-promoting factor contains the product of a *Xenopus* homolog of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2+*. *Cell* **54**(3): 433-439

Gavin AC, Aloy P, Grandi P, Krause R, Boesche M, Marzioch M, Rau C, Jensen LJ, Bastuck S, Dumpelfeld B, Edelmann A, Heurtier MA, Hoffman V, Hoefert C, Klein K, Hudak M, Michon AM, Schelder M, Schirle M, Remor M, Rudi T, Hooper S, Bauer A, Bouwmeester T, Casari G, Drewes G, Neubauer G, Rick JM, Kuster B, Bork P, Russell RB, Superti-Furga G (2006) Proteome survey reveals modularity of the yeast cell machinery. *Nature* **440**(7084): 631-636

Gavin AC, Bosche M, Krause R, Grandi P, Marzioch M, Bauer A, Schultz J, Rick JM, Michon AM, Cruciat CM, Remor M, Hofert C, Schelder M, Brajenovic M, Ruffner H, Merino A, Klein K, Hudak M, Dickson D, Rudi T, Gnau V, Bauch A, Bastuck S, Huhse B, Leutwein C, Heurtier MA, Copley RR, Edelmann A, Querfurth E, Rybin V, Drewes G, Raida M, Bouwmeester T, Bork P, Seraphin B, Kuster B, Neubauer G, Superti-Furga G (2002) Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* **415**(6868): 141-147

Gerards WL, de Jong WW, Bloemendal H, Boelens W (1998) The human proteasomal subunit HsC8 induces ring formation of other alpha-type subunits. *J Mol Biol* **275**(1): 113-121

Gerards WL, Enzlin J, Haner M, Hendriks IL, Aebi U, Bloemendal H, Boelens W (1997) The human alpha-type proteasomal subunit HsC8 forms a double ringlike structure, but does not assemble into proteasome-like particles with the beta-type subunits HsDelta or HsBPROS26. *J Biol Chem* **272**(15): 10080-10086

Gewurz BE, Harper JW (2006) DNA-damage control: Claspin destruction turns off the checkpoint. *Curr Biol* **16**(21): R932-934

Ghavidel A, Kislinger T, Pogoutse O, Sopko R, Jurisica I, Emili A (2007) Impaired tRNA nuclear export links DNA damage and cell-cycle checkpoint. *Cell* **131**(5): 915-926

Ghislain M, Udvardy A, Mann C (1993) *S. cerevisiae* 26S protease mutants arrest cell division in G2/metaphase. *Nature* **366**(6453): 358-362

Giannattasio M, Lazzaro F, Plevani P, Muzi-Falconi M (2005) The DNA damage checkpoint response requires histone H2B ubiquitination by Rad6-Bre1 and H3 methylation by Dot1. *J Biol Chem* **280**(11): 9879-9886

Gilbert CS, Green CM, Lowndes NF (2001) Budding yeast Rad9 is an ATP-dependent Rad53 activating machine. *Mol Cell* **8**(1): 129-136

Gillette TG, Gonzalez F, Delahodde A, Johnston SA, Kodadek T (2004) Physical and functional association of RNA polymerase II and the proteasome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(16): 5904-5909

Gillette TG, Huang W, Russell SJ, Reed SH, Johnston SA, Friedberg EC (2001) The 19S complex of the proteasome regulates nucleotide excision repair in yeast. *Genes Dev* **15**(12): 1528-1539

Gillette TG, Yu S, Zhou Z, Waters R, Johnston SA, Reed SH (2006) Distinct functions of the ubiquitin-proteasome pathway influence nucleotide excision repair. *EMBO J* **25**(11): 2529-2538

Glickman MH, Ciechanover A (2002) The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* **82**(2): 373-428

Glickman MH, Raveh D (2005) Proteasome plasticity. *FEBS Lett* **579**(15): 3214-3223

Glickman MH, Rubin DM, Coux O, Wefes I, Pfeifer G, Cjeka Z, Baumeister W, Fried VA, Finley D (1998a) A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3. *Cell* **94**(5): 615-623

Glickman MH, Rubin DM, Fried VA, Finley D (1998b) The regulatory particle of the *Saccharomyces cerevisiae* proteasome. *Mol Cell Biol* **18**(6): 3149-3162

Glutzer M, Murray AW, Kirschner MW (1991) Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* **349**(6305): 132-138

Goldberg AL (2007) Functions of the proteasome: from protein degradation and immune surveillance to cancer therapy. *Biochem Soc Trans* **35**(Pt 1): 12-17

Goldberg AL, Cascio P, Saric T, Rock KL (2002) The importance of the proteasome and subsequent proteolytic steps in the generation of antigenic peptides. *Mol Immunol* **39**(3-4): 147-164

Goldberg AL, St John AC (1976) Intracellular protein degradation in mammalian and bacterial cells: Part 2. *Annu Rev Biochem* **45**: 747-803

Goldknopf IL, Busch H (1977) Isopeptide linkage between nonhistone and histone 2A polypeptides of chromosomal conjugate-protein A24. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**(3): 864-868

Goldstein AL, McCusker JH (1999) Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **15**(14): 1541-1553

Goldstein G, Scheid M, Hammerling U, Schlesinger DH, Niall HD, Boyse EA (1975) Isolation of a polypeptide that has lymphocyte-differentiating properties and is probably represented universally in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**(1): 11-15

Gonzalez F, Delahodde A, Kodadek T, Johnston SA (2002) Recruitment of a 19S proteasome subcomplex to an activated promoter. *Science* **296**(5567): 548-550

Gorbea C, Goellner GM, Teter K, Holmes RK, Rechsteiner M (2004) Characterization of mammalian Ecm29, a 26 S proteasome-associated protein that localizes to the nucleus and membrane vesicles. *J Biol Chem* **279**(52): 54849-54861

Gorbea C, Taillandier D, Rechsteiner M (2000) Mapping subunit contacts in the regulatory complex of the 26 S proteasome. S2 and S5b form a tetramer with ATPase subunits S4 and S7. *J Biol Chem* **275**(2): 875-882

Green CM, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Lowndes NF (2000) A novel Rad24 checkpoint protein complex closely related to replication factor C. *Curr Biol* **10**(1): 39-42

Gregori L, Poosch MS, Cousins G, Chau V (1990) A uniform isopeptide-linked multiubiquitin chain is sufficient to target substrate for degradation in ubiquitin-mediated proteolysis. *J Biol Chem* **265**(15): 8354-8357

Gregory RC, Taniguchi T, D'Andrea AD (2003) Regulation of the Fanconi anemia pathway by monoubiquitination. *Semin Cancer Biol* **13**(1): 77-82

Griffin TA, Slack JP, McCluskey TS, Monaco JJ, Colbert RA (2000) Identification of proteasemblin, a mammalian homologue of the yeast protein, Ump1p, that is required for normal proteasome assembly. *Mol Cell Biol Res Commun* **3**(4): 212-217

Griffiths DJ, Barbet NC, McCready S, Lehmann AR, Carr AM (1995) Fission yeast rad17: a homologue of budding yeast RAD24 that shares regions of sequence similarity with DNA polymerase accessory proteins. *EMBO J* **14**(23): 5812-5823

- Groll M, Bajorek M, Kohler A, Moroder L, Rubin DM, Huber R, Glickman MH, Finley D** (2000) A gated channel into the proteasome core particle. *Nat Struct Biol* **7**(11): 1062-1067
- Groll M, Bochtler M, Brandstetter H, Clausen T, Huber R** (2005) Molecular machines for protein degradation. *ChemBiochem* **6**(2): 222-256
- Groll M, Ditzel L, Lowe J, Stock D, Bochtler M, Bartunik HD, Huber R** (1997) Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature* **386**(6624): 463-471
- Groll M, Heinemeyer W, Jager S, Ullrich T, Bochtler M, Wolf DH, Huber R** (1999) The catalytic sites of 20S proteasomes and their role in subunit maturation: a mutational and crystallographic study. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(20): 10976-10983
- Gudmundsdottir K, Ashworth A** (2006) The roles of BRCA1 and BRCA2 and associated proteins in the maintenance of genomic stability. *Oncogene* **25**(43): 5864-5874
- Gudmundsdottir K, Lord CJ, Witt E, Tutt AN, Ashworth A** (2004) DSS1 is required for RAD51 focus formation and genomic stability in mammalian cells. *EMBO Rep* **5**(10): 989-993
- Guerrero C, Tagwerker C, Kaiser P, Huang L** (2006) An integrated mass spectrometry-based proteomic approach: quantitative analysis of tandem affinity-purified in vivo cross-linked protein complexes (QTAX) to decipher the 26 S proteasome-interacting network. *Mol Cell Proteomics* **5**(2): 366-378
- Guillemain G, Ma E, Mauger S, Miron S, Thai R, Guerois R, Ochsenbein F, Marsolier-Kergoat MC** (2007) Mechanisms of checkpoint kinase Rad53 inactivation after a double-strand break in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **27**(9): 3378-3389
- Gunjan A, Verreault A** (2003) A Rad53 kinase-dependent surveillance mechanism that regulates histone protein levels in *S. cerevisiae*. *Cell* **115**(5): 537-549
- Guthrie C, Fink GR** (2004) Guide to Yeast Genetics and Molecular and Cell Biology, Part A. *Methods in Enzymology*. Elsevier Academic Press.
- Haaf T, Golub EI, Reddy G, Radding CM, Ward DC** (1995) Nuclear foci of mammalian Rad51 recombination protein in somatic cells after DNA damage and its localization in synaptonemal complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(6): 2298-2302
- Haghnazari E, Heyer WD** (2004) The Hog1 MAP kinase pathway and the Mec1 DNA damage checkpoint pathway independently control the cellular responses to hydrogen peroxide. *DNA Repair (Amst)* **3**(7): 769-776
- Hahn JS, Neef DW, Thiele DJ** (2006) A stress regulatory network for co-ordinated activation of proteasome expression mediated by yeast heat shock transcription factor. *Mol Microbiol* **60**(1): 240-251
- Hamazaki J, Iemura S, Natsume T, Yashiroda H, Tanaka K, Murata S** (2006) A novel proteasome interacting protein recruits the deubiquitinating enzyme UCH37 to 26S proteasomes. *EMBO J* **25**(19): 4524-4536

Hammet A, Pike BL, Heierhorst J (2002) Posttranscriptional regulation of the RAD5 DNA repair gene by the Dun1 kinase and the Pan2-Pan3 poly(A)-nuclease complex contributes to survival of replication blocks. *J Biol Chem* **277**(25): 22469-22474

Hanna J, Finley D (2007) A proteasome for all occasions. *FEBS Lett* **581**(15): 2854-2861

Hanna J, Hathaway NA, Tone Y, Crosas B, Elsasser S, Kirkpatrick DS, Leggett DS, Gygi SP, King RW, Finley D (2006) Deubiquitinating enzyme Ubp6 functions noncatalytically to delay proteasomal degradation. *Cell* **127**(1): 99-111

Hanna J, Meides A, Zhang DP, Finley D (2007) A ubiquitin stress response induces altered proteasome composition. *Cell* **129**(4): 747-759

Harrison JC, Haber JE (2006) Surviving the breakup: the DNA damage checkpoint. *Annu Rev Genet* **40**: 209-235

Hartmann-Petersen R, Hendil KB, Gordon C (2003) Ubiquitin binding proteins protect ubiquitin conjugates from disassembly. *FEBS Lett* **535**(1-3): 77-81

Hartmann-Petersen R, Tanaka K, Hendil KB (2001) Quaternary structure of the ATPase complex of human 26S proteasomes determined by chemical cross-linking. *Arch Biochem Biophys* **386**(1): 89-94

Hartwell LH, Culotti J, Pringle JR, Reid BJ (1974) Genetic control of the cell division cycle in yeast. *Science* **183**(120): 46-51

Hartwell LH, Weinert TA (1989) Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* **246**(4930): 629-634

Hase J, Kobashi K, Nakai N, Mitsui K, Iwata K, Takadera T (1980) The quaternary structure of carp muscle alkaline protease. *Biochim Biophys Acta* **611**(1): 205-213

Hatakeyama S, Yada M, Matsumoto M, Ishida N, Nakayama KI (2001) U box proteins as a new family of ubiquitin-protein ligases. *J Biol Chem* **276**(35): 33111-33120

Hatfield PM, Gosink MM, Carpenter TB, Vierstra RD (1997) The ubiquitin-activating enzyme (E1) gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **11**(2): 213-226

He F, Li X, Spatrick P, Casillo R, Dong S, Jacobson A (2003) Genome-wide analysis of mRNAs regulated by the nonsense-mediated and 5' to 3' mRNA decay pathways in yeast. *Mol Cell* **12**(6): 1439-1452

Heideker J, Lis ET, Romesberg FE (2007) Phosphatases, DNA damage checkpoints and checkpoint deactivation. *Cell Cycle* **6**(24): 3058-3064

Heinemeyer W, Fischer M, Krimmer T, Stachon U, Wolf DH (1997) The active sites of the eukaryotic 20 S proteasome and their involvement in subunit precursor processing. *J Biol Chem* **272**(40): 25200-25209

Heinemeyer W, Gruhler A, Mohrle V, Mahe Y, Wolf DH (1993) PRE2, highly homologous to the human major histocompatibility complex-linked RING10 gene, codes for a yeast proteasome subunit necessary for chymotryptic activity and degradation of ubiquitinated proteins. *J Biol Chem* **268**(7): 5115-5120

Heinemeyer W, Kleinschmidt JA, Saidowsky J, Escher C, Wolf DH (1991) Proteinase yscE, the yeast proteasome/multicatalytic-multifunctional proteinase: mutants unravel its function in stress induced proteolysis and uncover its necessity for cell survival. *EMBO J* **10**(3): 555-562

Heinemeyer W, Ramos PC, Dohmen RJ (2004) The ultimate nanoscale mincer: assembly, structure and active sites of the 20S proteasome core. *Cell Mol Life Sci* **61**(13): 1562-1578

Heinemeyer W, Trondle N, Albrecht G, Wolf DH (1994) PRE5 and PRE6, the last missing genes encoding 20S proteasome subunits from yeast? Indication for a set of 14 different subunits in the eukaryotic proteasome core. *Biochemistry* **33**(40): 12229-12237

Henke W, Ferrell K, Bech-Otschir D, Seeger M, Schade R, Jungblut P, Naumann M, Dubiel W (1999) Comparison of human COP9 signalsome and 26S proteasome lid'. *Mol Biol Rep* **26**(1-2): 29-34

Hershko A, Ciechanover A (1998) The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* **67**: 425-479

Hershko A, Ciechanover A, Heller H, Haas AL, Rose IA (1980) Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of protein with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**(4): 1783-1786

Hershko A, Eytan E, Ciechanover A, Haas AL (1982) Immunochemical analysis of the turnover of ubiquitin-protein conjugates in intact cells. Relationship to the breakdown of abnormal proteins. *J Biol Chem* **257**(23): 13964-13970

Hershko A, Heller H, Elias S, Ciechanover A (1983) Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown. *J Biol Chem* **258**(13): 8206-8214

Hershko A, Tomkins GM (1971) Studies on the degradation of tyrosine aminotransferase in hepatoma cells in culture. Influence of the composition of the medium and adenosine triphosphate dependence. *J Biol Chem* **246**(3): 710-714

Herzberg K, Bashkirov VI, Rolfsmeier M, Haghnazari E, McDonald WH, Anderson S, Bashkirova EV, Yates JR, 3rd, Heyer WD (2006) Phosphorylation of Rad55 on serines 2, 8, and 14 is required for efficient homologous recombination in the recovery of stalled replication forks. *Mol Cell Biol* **26**(22): 8396-8409

Hicke L, Schubert HL, Hill CP (2005) Ubiquitin-binding domains. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**(8): 610-621

Hirano Y, Hayashi H, Iemura S, Hendil KB, Niwa S, Kishimoto T, Kasahara M, Natsume T, Tanaka K, Murata S (2006) Cooperation of multiple chaperones required for the assembly of mammalian 20S proteasomes. *Mol Cell* **24**(6): 977-984

Hirano Y, Hendil KB, Yashiroda H, Iemura S, Nagane R, Hioki Y, Natsume T, Tanaka K, Murata S (2005) A heterodimeric complex that promotes the assembly of mammalian 20S proteasomes. *Nature* **437**(7063): 1381-1385

Hirano Y, Sugimoto K (2006) ATR homolog Mec1 controls association of DNA polymerase zeta-Rev1 complex with regions near a double-strand break. *Curr Biol* **16**(6): 586-590

Hiyama H, Yokoi M, Masutani C, Sugasawa K, Maekawa T, Tanaka K, Hoeijmakers JH, Hanaoka F (1999) Interaction of hHR23 with S5a. The ubiquitin-like domain of hHR23 mediates interaction with S5a subunit of 26 S proteasome. *J Biol Chem* **274**(39): 28019-28025

Ho Y, Gruhler A, Heilbut A, Bader GD, Moore L, Adams SL, Millar A, Taylor P, Bennett K, Boutilier K, Yang L, Wolting C, Donaldson I, Schandorff S, Shewnarane J, Vo M, Taggart J, Goudreau M, Muskata B, Alfarano C, Dewar D, Lin Z, Michalickova K, Willems AR, Sassi H, Nielsen PA, Rasmussen KJ, Andersen JR, Johansen LE, Hansen LH, Jespersen H, Podtelejnikov A, Nielsen E, Crawford J, Poulsen V, Sorensen BD, Matthiesen J, Hendrickson RC, Gleeson F, Pawson T, Moran MF, Durocher D, Mann M, Hogue CW, Figeys D, Tyers M (2002) Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. *Nature* **415**(6868): 180-183

Hochstrasser M, Varshavsky A (1990) In vivo degradation of a transcriptional regulator: the yeast alpha 2 repressor. *Cell* **61**(4): 697-708

Hoffman L, Pratt G, Rechsteiner M (1992) Multiple forms of the 20 S multicatalytic and the 26 S ubiquitin/ATP-dependent proteases from rabbit reticulocyte lysate. *J Biol Chem* **267**(31): 22362-22368

Hofmann K, Bucher P (1998) The PCI domain: a common theme in three multiprotein complexes. *Trends Biochem Sci* **23**(6): 204-205

Hofmann K, Falquet L (2001) A ubiquitin-interacting motif conserved in components of the proteasomal and lysosomal protein degradation systems. *Trends Biochem Sci* **26**(6): 347-350

Hohmann S (2002) Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**(2): 300-372

Holzthutter HG, Frommel C, Kloetzel PM (1999) A theoretical approach towards the identification of cleavage-determining amino acid motifs of the 20 S proteasome. *J Mol Biol* **286**(4): 1251-1265

Hood JK, Silver PA (1999) In or out? Regulating nuclear transport. *Curr Opin Cell Biol* **11**(2): 241-247

Hoppe T, Matuschewski K, Rape M, Schlenker S, Ulrich HD, Jentsch S (2000) Activation of a membrane-bound transcription factor by regulated ubiquitin/proteasome-dependent processing. *Cell* **102**(5): 577-586

Hough R, Pratt G, Rechsteiner M (1987) Purification of two high molecular weight proteases from rabbit reticulocyte lysate. *J Biol Chem* **262**(17): 8303-8313

- Hough R, Pratt G, Rechsteiner M** (1986) Ubiquitin-lysozyme conjugates. Identification and characterization of an ATP-dependent protease from rabbit reticulocyte lysates. *J Biol Chem* **261**(5): 2400-2408
- Hoyt MA, McDonough S, Pimpl SA, Scheel H, Hofmann K, Coffino P** (2008) A genetic screen for *Saccharomyces cerevisiae* mutants affecting proteasome function, using a ubiquitin-independent substrate. *Yeast* **25**(3): 199-217
- Hoyt MA, Totis L, Roberts BT** (1991) *S. cerevisiae* genes required for cell cycle arrest in response to loss of microtubule function. *Cell* **66**(3): 507-517
- Hu F, Alcasabas AA, Elledge SJ** (2001a) Asf1 links Rad53 to control of chromatin assembly. *Genes Dev* **15**(9): 1061-1066
- Hu F, Wang Y, Liu D, Li Y, Qin J, Elledge SJ** (2001b) Regulation of the Bub2/Bfa1 GAP complex by Cdc5 and cell cycle checkpoints. *Cell* **107**(5): 655-665
- Huang M, Zhou Z, Elledge SJ** (1998) The DNA replication and damage checkpoint pathways induce transcription by inhibition of the Crt1 repressor. *Cell* **94**(5): 595-605
- Husnjak K, Elsasser S, Zhang N, Chen X, Randles L, Shi Y, Hofmann K, Walters KJ, Finley D, Dikic I** (2008) Proteasome subunit Rpn13 is a novel ubiquitin receptor. *Nature* **453**(7194): 481-488
- Hwang WW, Venkatasubrahmanyam S, Ianculescu AG, Tong A, Boone C, Madhani HD** (2003) A conserved RING finger protein required for histone H2B monoubiquitination and cell size control. *Mol Cell* **11**(1): 261-266
- Imai J, Maruya M, Yashiroda H, Yahara I, Tanaka K** (2003) The molecular chaperone Hsp90 plays a role in the assembly and maintenance of the 26S proteasome. *EMBO J* **22**(14): 3557-3567
- Isono E, Nishihara K, Saeki Y, Yashiroda H, Kamata N, Ge L, Ueda T, Kikuchi Y, Tanaka K, Nakano A, Toh-e A** (2007) The assembly pathway of the 19S regulatory particle of the yeast 26S proteasome. *Mol Biol Cell* **18**(2): 569-580
- Isono E, Saeki Y, Yokosawa H, Toh-e A** (2004) Rpn7 Is required for the structural integrity of the 26 S proteasome of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **279**(26): 27168-27176
- Isono E, Saito N, Kamata N, Saeki Y, Toh EA** (2005) Functional analysis of Rpn6p, a lid component of the 26 S proteasome, using temperature-sensitive rpn6 mutants of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **280**(8): 6537-6547
- Ito T, Chiba T, Ozawa R, Yoshida M, Hattori M, Sakaki Y** (2001) A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(8): 4569-4574

- Iwanczyk J, Sadre-Bazzaz K, Ferrell K, Kondrashkina E, Formosa T, Hill CP, Ortega J** (2006) Structure of the Blm10-20 S proteasome complex by cryo-electron microscopy. Insights into the mechanism of activation of mature yeast proteasomes. *J Mol Biol* **363**(3): 648-659
- Jacquemont C, Taniguchi T** (2007) Proteasome function is required for DNA damage response and fanconi anemia pathway activation. *Cancer Res* **67**(15): 7395-7405
- Jariel-Encontre I, Bossis G, Piechaczyk M** (2008) Ubiquitin-independent degradation of proteins by the proteasome. *Biochim Biophys Acta*
- Jarvis EE, Hagen DC, Sprague GF, Jr.** (1988) Identification of a DNA segment that is necessary and sufficient for alpha-specific gene control in *Saccharomyces cerevisiae*: implications for regulation of alpha-specific and a-specific genes. *Mol Cell Biol* **8**(1): 309-320
- Jelinsky SA, Estep P, Church GM, Samson LD** (2000) Regulatory networks revealed by transcriptional profiling of damaged *Saccharomyces cerevisiae* cells: Rpn4 links base excision repair with proteasomes. *Mol Cell Biol* **20**(21): 8157-8167
- Jelinsky SA, Samson LD** (1999) Global response of *Saccharomyces cerevisiae* to an alkylating agent. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(4): 1486-1491
- Jia X, Weinert T, Lydall D** (2004) Mec1 and Rad53 inhibit formation of single-stranded DNA at telomeres of *Saccharomyces cerevisiae* cdc13-1 mutants. *Genetics* **166**(2): 753-764
- Jin J, Li X, Gygi SP, Harper JW** (2007) Dual E1 activation systems for ubiquitin differentially regulate E2 enzyme charging. *Nature* **447**(7148): 1135-1138
- Josse L, Harley ME, Pires IM, Hughes DA** (2006) Fission yeast Dss1 associates with the proteasome and is required for efficient ubiquitin-dependent proteolysis. *Biochem J* **393**(Pt 1): 303-309
- Ju D, Wang L, Mao X, Xie Y** (2004) Homeostatic regulation of the proteasome via an Rpn4-dependent feedback circuit. *Biochem Biophys Res Commun* **321**(1): 51-57
- Ju D, Xie Y** (2006) Identification of the preferential ubiquitination site and ubiquitin-dependent degradation signal of Rpn4. *J Biol Chem* **281**(16): 10657-10662
- Ju D, Xie Y** (2004) Proteasomal degradation of RPN4 via two distinct mechanisms, ubiquitin-dependent and -independent. *J Biol Chem* **279**(23): 23851-23854
- Jungwirth H, Kuchler K** (2006) Yeast ABC transporters-- a tale of sex, stress, drugs and aging. *FEBS Lett* **580**(4): 1131-1138
- Kai M, Boddy MN, Russell P, Wang TS** (2005) Replication checkpoint kinase Cds1 regulates Mus81 to preserve genome integrity during replication stress. *Genes Dev* **19**(8): 919-932

Kajava AV (2002) What curves alpha-solenoids? Evidence for an alpha-helical toroid structure of Rpn1 and Rpn2 proteins of the 26 S proteasome. *J Biol Chem* **277**(51): 49791-49798

Kamura T, Hara T, Matsumoto M, Ishida N, Okumura F, Hatakeyama S, Yoshida M, Nakayama K, Nakayama KI (2004) Cytoplasmic ubiquitin ligase KPC regulates proteolysis of p27(Kip1) at G1 phase. *Nat Cell Biol* **6**(12): 1229-1235

Kanayama A, Seth RB, Sun L, Ea CK, Hong M, Shaito A, Chiu YH, Deng L, Chen ZJ (2004) TAB2 and TAB3 activate the NF-kappaB pathway through binding to polyubiquitin chains. *Mol Cell* **15**(4): 535-548

Kawamoto T, Araki K, Sonoda E, Yamashita YM, Harada K, Kikuchi K, Masutani C, Hanaoka F, Nozaki K, Hashimoto N, Takeda S (2005) Dual roles for DNA polymerase eta in homologous DNA recombination and translesion DNA synthesis. *Mol Cell* **20**(5): 793-799

Kenniston JA, Baker TA, Fernandez JM, Sauer RT (2003) Linkage between ATP consumption and mechanical unfolding during the protein processing reactions of an AAA+ degradation machine. *Cell* **114**(4): 511-520

Keogh MC, Kim JA, Downey M, Fillingham J, Chowdhury D, Harrison JC, Onishi M, Datta N, Galicia S, Emili A, Lieberman J, Shen X, Buratowski S, Haber JE, Durocher D, Greenblatt JF, Krogan NJ (2006) A phosphatase complex that dephosphorylates gammaH2AX regulates DNA damage checkpoint recovery. *Nature* **439**(7075): 497-501

Kerscher O, Felberbaum R, Hochstrasser M (2006) Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* **22**: 159-180

Kim HT, Kim KP, Lledias F, Kisselev AF, Scaglione KM, Skowyra D, Gygi SP, Goldberg AL (2007) Certain pairs of ubiquitin-conjugating enzymes (E2s) and ubiquitin-protein ligases (E3s) synthesize nondegradable forked ubiquitin chains containing all possible isopeptide linkages. *J Biol Chem* **282**(24): 17375-17386

Kisselev AF, Akopian TN, Castillo V, Goldberg AL (1999a) Proteasome active sites allosterically regulate each other, suggesting a cyclical bite-chew mechanism for protein breakdown. *Mol Cell* **4**(3): 395-402

Kisselev AF, Akopian TN, Woo KM, Goldberg AL (1999b) The sizes of peptides generated from protein by mammalian 26 and 20 S proteasomes. Implications for understanding the degradative mechanism and antigen presentation. *J Biol Chem* **274**(6): 3363-3371

Kisselev AF, Callard A, Goldberg AL (2006) Importance of the different proteolytic sites of the proteasome and the efficacy of inhibitors varies with the protein substrate. *J Biol Chem* **281**(13): 8582-8590

Kisselev AF, Kaganovich D, Goldberg AL (2002) Binding of hydrophobic peptides to several non-catalytic sites promotes peptide hydrolysis by all active sites of 20 S proteasomes. Evidence for peptide-induced channel opening in the alpha-rings. *J Biol Chem* **277**(25): 22260-22270

Kleijnen MF, Roelofs J, Park S, Hathaway NA, Glickman M, King RW, Finley D (2007) Stability of the proteasome can be regulated allosterically through engagement of its proteolytic active sites. *Nat Struct Mol Biol* **14**(12): 1180-1188

Kleiman FE, Wu-Baer F, Fonseca D, Kaneko S, Baer R, Manley JL (2005) BRCA1/BARD1 inhibition of mRNA 3' processing involves targeted degradation of RNA polymerase II. *Genes Dev* **19**(10): 1227-1237

Koegl M, Hoppe T, Schlenker S, Ulrich HD, Mayer TU, Jentsch S (1999) A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell* **96**(5): 635-644

Kohler A, Cascio P, Leggett DS, Woo KM, Goldberg AL, Finley D (2001) The axial channel of the proteasome core particle is gated by the Rpt2 ATPase and controls both substrate entry and product release. *Mol Cell* **7**(6): 1143-1152

Koi M, Umar A, Chauhan DP, Cherian SP, Carethers JM, Kunkel TA, Boland CR (1994) Human chromosome 3 corrects mismatch repair deficiency and microsatellite instability and reduces N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine tolerance in colon tumor cells with homozygous hMLH1 mutation. *Cancer Res* **54**(16): 4308-4312

Kojic M, Yang H, Kostrub CF, Pavletich NP, Holloman WK (2003) The BRCA2-interacting protein DSS1 is vital for DNA repair, recombination, and genome stability in *Ustilago maydis*. *Mol Cell* **12**(4): 1043-1049

Kondo T, Wakayama T, Naiki T, Matsumoto K, Sugimoto K (2001) Recruitment of Mec1 and Ddc1 checkpoint proteins to double-strand breaks through distinct mechanisms. *Science* **294**(5543): 867-870

Krishnan V, Nirantar S, Crasta K, Cheng AY, Surana U (2004) DNA replication checkpoint prevents precocious chromosome segregation by regulating spindle behavior. *Mol Cell* **16**(5): 687-700

Krogan NJ, Cagney G, Yu H, Zhong G, Guo X, Ignatchenko A, Li J, Pu S, Datta N, Tikuisis AP, Punna T, Peregrin-Alvarez JM, Shales M, Zhang X, Davey M, Robinson MD, Paccanaro A, Bray JE, Sheung A, Beattie B, Richards DP, Canadien V, Lalev A, Mena F, Wong P, Starostine A, Canete MM, Vlasblom J, Wu S, Orsi C, Collins SR, Chandran S, Haw R, Rilstone JJ, Gandi K, Thompson NJ, Musso G, St Onge P, Ghanny S, Lam MH, Butland G, Altaf-Ul AM, Kanaya S, Shilatifard A, O'Shea E, Weissman JS, Ingles CJ, Hughes TR, Parkinson J, Gerstein M, Wodak SJ, Emili A, Greenblatt JF (2006) Global landscape of protein complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **440**(7084): 637-643

Krogan NJ, Lam MH, Fillingham J, Keogh MC, Gebbia M, Li J, Datta N, Cagney G, Buratowski S, Emili A, Greenblatt JF (2004) Proteasome involvement in the repair of DNA double-strand breaks. *Mol Cell* **16**(6): 1027-1034

Kushner DB, Lindenbach BD, Grdzlishvili VZ, Noueir AO, Paul SM, Ahlquist P (2003) Systematic, genome-wide identification of host genes affecting replication of a positive-strand RNA virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(26): 15764-15769

- Kusmierczyk AR, Kunjappu MJ, Funakoshi M, Hochstrasser M** (2008) A multimeric assembly factor controls the formation of alternative 20S proteasomes. *Nat Struct Mol Biol* **15**(3): 237-244
- Lafarga M, Fernandez R, Mayo I, Berciano MT, Castano JG** (2002) Proteasome dynamics during cell cycle in rat Schwann cells. *Glia* **38**(4): 313-328
- Lam YA, Lawson TG, Velayutham M, Zweier JL, Pickart CM** (2002) A proteasomal ATPase subunit recognizes the polyubiquitin degradation signal. *Nature* **416**(6882): 763-767
- Lam YA, Xu W, DeMartino GN, Cohen RE** (1997) Editing of ubiquitin conjugates by an isopeptidase in the 26S proteasome. *Nature* **385**(6618): 737-740
- Laporte D, Salin B, Daignan-Fornier B, Sagot I** (2008) Reversible cytoplasmic localization of the proteasome in quiescent yeast cells. *J Cell Biol* **181**(5): 737-745
- Lassot I, Latreille D, Rousset E, Sourisseau M, Linares LK, Chable-Bessia C, Coux O, Benkirane M, Kiernan RE** (2007) The proteasome regulates HIV-1 transcription by both proteolytic and nonproteolytic mechanisms. *Mol Cell* **25**(3): 369-383
- Le Tallec B, Barrault MB, Courbeyrette R, Guerois R, Marsolier-Kergoat MC, Peyroche A** (2007) 20S proteasome assembly is orchestrated by two distinct pairs of chaperones in yeast and in mammals. *Mol Cell* **27**(4): 660-674
- Lee C, Prakash S, Matouschek A** (2002) Concurrent translocation of multiple polypeptide chains through the proteasomal degradation channel. *J Biol Chem* **277**(38): 34760-34765
- Lee C, Schwartz MP, Prakash S, Iwakura M, Matouschek A** (2001) ATP-dependent proteases degrade their substrates by processively unraveling them from the degradation signal. *Mol Cell* **7**(3): 627-637
- Lee D, Ezhkova E, Li B, Pattenden SG, Tansey WP, Workman JL** (2005) The proteasome regulatory particle alters the SAGA coactivator to enhance its interactions with transcriptional activators. *Cell* **123**(3): 423-436
- Lee SE, Moore JK, Holmes A, Umez K, Kolodner RD, Haber JE** (1998) Saccharomyces Ku70, mre11/rad50 and RPA proteins regulate adaptation to G2/M arrest after DNA damage. *Cell* **94**(3): 399-409
- Lee SE, Pelliccioli A, Demeter J, Vaze MP, Gasch AP, Malkova A, Brown PO, Botstein D, Stearns T, Foiani M, Haber JE** (2000) Arrest, adaptation, and recovery following a chromosome double-strand break in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **65**: 303-314
- Lee SE, Pelliccioli A, Vaze MB, Sugawara N, Malkova A, Foiani M, Haber JE** (2003a) Yeast Rad52 and Rad51 recombination proteins define a second pathway of DNA damage assessment in response to a single double-strand break. *Mol Cell Biol* **23**(23): 8913-8923
- Lee SJ, Schwartz MF, Duong JK, Stern DF** (2003b) Rad53 phosphorylation site clusters are important for Rad53 regulation and signaling. *Mol Cell Biol* **23**(17): 6300-6314

Leggett DS, Hanna J, Borodovsky A, Crosas B, Schmidt M, Baker RT, Walz T, Ploegh H, Finley D (2002) Multiple associated proteins regulate proteasome structure and function. *Mol Cell* **10**(3): 495-507

Lehmann A, Janek K, Braun B, Kloetzel PM, Enenkel C (2002) 20 S proteasomes are imported as precursor complexes into the nucleus of yeast. *J Mol Biol* **317**(3): 401-413

Lemoine FJ, Degtyareva NP, Lobachev K, Petes TD (2005) Chromosomal translocations in yeast induced by low levels of DNA polymerase α a model for chromosome fragile sites. *Cell* **120**(5): 587-598

Leroy C, Lee SE, Vaze MB, Ochsenbien F, Guerois R, Haber JE, Marsolier-Kergoat MC (2003) PP2C phosphatases Ptc2 and Ptc3 are required for DNA checkpoint inactivation after a double-strand break. *Mol Cell* **11**(3): 827-835

Leroy C, Mann C, Marsolier MC (2001) Silent repair accounts for cell cycle specificity in the signaling of oxidative DNA lesions. *EMBO J* **20**(11): 2896-2906

Li GM (2008) Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Res* **18**(1): 85-98

Li R, Murray AW (1991) Feedback control of mitosis in budding yeast. *Cell* **66**(3): 519-531

Li X, Kusmierczyk AR, Wong P, Emili A, Hochstrasser M (2007) beta-Subunit appendages promote 20S proteasome assembly by overcoming an Ump1-dependent checkpoint. *EMBO J* **26**(9): 2339-2349

Lis ET, Romesberg FE (2006) Role of Doa1 in the *Saccharomyces cerevisiae* DNA damage response. *Mol Cell Biol* **26**(11): 4122-4133

Lisby M, Barlow JH, Burgess RC, Rothstein R (2004) Choreography of the DNA damage response: spatiotemporal relationships among checkpoint and repair proteins. *Cell* **118**(6): 699-713

Lisby M, Rothstein R, Mortensen UH (2001) Rad52 forms DNA repair and recombination centers during S phase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(15): 8276-8282

Liu CW, Corboy MJ, DeMartino GN, Thomas PJ (2003) Endoproteolytic activity of the proteasome. *Science* **299**(5605): 408-411

Liu CW, Li X, Thompson D, Wooding K, Chang TL, Tang Z, Yu H, Thomas PJ, DeMartino GN (2006) ATP binding and ATP hydrolysis play distinct roles in the function of 26S proteasome. *Mol Cell* **24**(1): 39-50

Liu CW, Millen L, Roman TB, Xiong H, Gilbert HF, Noiva R, DeMartino GN, Thomas PJ (2002) Conformational remodeling of proteasomal substrates by PA700, the 19 S regulatory complex of the 26 S proteasome. *J Biol Chem* **277**(30): 26815-26820

London MK, Keck BI, Ramos PC, Dohmen RJ (2004) Regulatory mechanisms controlling biogenesis of ubiquitin and the proteasome. *FEBS Lett* **567**(2-3): 259-264

Lopes M, Cotta-Ramusino C, Pelliccioli A, Liberi G, Plevani P, Muzi-Falconi M, Newlon CS, Foiani M (2001) The DNA replication checkpoint response stabilizes stalled replication forks. *Nature* **412**(6846): 557-561

Lopes M, Foiani M, Sogo JM (2006) Multiple mechanisms control chromosome integrity after replication fork uncoupling and restart at irreparable UV lesions. *Mol Cell* **21**(1): 15-27

Lowe J, Stock D, Jap B, Zwickl P, Baumeister W, Huber R (1995) Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution. *Science* **268**(5210): 533-539

Lucca C, Vanoli F, Cotta-Ramusino C, Pelliccioli A, Liberi G, Haber J, Foiani M (2004) Checkpoint-mediated control of replisome-fork association and signalling in response to replication pausing. *Oncogene* **23**(6): 1206-1213

Lundgren J, Masson P, Realini CA, Young P (2003) Use of RNA interference and complementation to study the function of the *Drosophila* and human 26S proteasome subunit S13. *Mol Cell Biol* **23**(15): 5320-5330

Lupas A, Baumeister W, Hofmann K (1997) A repetitive sequence in subunits of the 26S proteasome and 20S cyclosome (anaphase-promoting complex). *Trends Biochem Sci* **22**(6): 195-196

Lydall D, Weinert T (1995) Yeast checkpoint genes in DNA damage processing: implications for repair and arrest. *Science* **270**(5241): 1488-1491

Ma CP, Willy PJ, Slaughter CA, DeMartino GN (1993) PA28, an activator of the 20 S proteasome, is inactivated by proteolytic modification at its carboxyl terminus. *J Biol Chem* **268**(30): 22514-22519

Ma J, Katz E, Belote JM (2002) Expression of proteasome subunit isoforms during spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Insect Mol Biol* **11**(6): 627-639

Majka J, Binz SK, Wold MS, Burgers PM (2006a) Replication protein A directs loading of the DNA damage checkpoint clamp to 5'-DNA junctions. *J Biol Chem* **281**(38): 27855-27861

Majka J, Burgers PM (2003) Yeast Rad17/Mec3/Ddc1: a sliding clamp for the DNA damage checkpoint. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(5): 2249-2254

Majka J, Niedziela-Majka A, Burgers PM (2006b) The checkpoint clamp activates Mec1 kinase during initiation of the DNA damage checkpoint. *Mol Cell* **24**(6): 891-901

Mangus DA, Amrani N, Jacobson A (1998) Pbp1p, a factor interacting with *Saccharomyces cerevisiae* poly(A)-binding protein, regulates polyadenylation. *Mol Cell Biol* **18**(12): 7383-7396

Mannhaupt G, Schnall R, Karpov V, Vetter I, Feldmann H (1999) Rpn4p acts as a transcription factor by binding to PACE, a nonamer box found upstream of 26S proteasomal and other genes in yeast. *FEBS Lett* **450**(1-2): 27-34

- Marques AJ, Glanemann C, Ramos PC, Dohmen RJ** (2007) The C-terminal extension of the beta7 subunit and activator complexes stabilize nascent 20 S proteasomes and promote their maturation. *J Biol Chem* **282**(48): 34869-34876
- Marsolier MC, Roussel P, Leroy C, Mann C** (2000) Involvement of the PP2C-like phosphatase Ptc2p in the DNA checkpoint pathways of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **154**(4): 1523-1532
- Marston NJ, Richards WJ, Hughes D, Bertwistle D, Marshall CJ, Ashworth A** (1999) Interaction between the product of the breast cancer susceptibility gene BRCA2 and DSS1, a protein functionally conserved from yeast to mammals. *Mol Cell Biol* **19**(7): 4633-4642
- Mason GG, Murray RZ, Pappin D, Rivett AJ** (1998) Phosphorylation of ATPase subunits of the 26S proteasome. *FEBS Lett* **430**(3): 269-274
- Masui Y, Markert CL** (1971) Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J Exp Zool* **177**(2): 129-145
- Matsuoka S, Ballif BA, Smogorzewska A, McDonald ER, 3rd, Hurov KE, Luo J, Bakalarski CE, Zhao Z, Solimini N, Lerenthal Y, Shiloh Y, Gygi SP, Elledge SJ** (2007) ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science* **316**(5828): 1160-1166
- McIlwraith MJ, Vaisman A, Liu Y, Fanning E, Woodgate R, West SC** (2005) Human DNA polymerase eta promotes DNA synthesis from strand invasion intermediates of homologous recombination. *Mol Cell* **20**(5): 783-792
- McIntyre J, Baranowska H, Skoneczna A, Halas A, Sledziewska-Gojska E** (2007) The spectrum of spontaneous mutations caused by deficiency in proteasome maturase Ump1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* **52**(5-6): 221-228
- McIntyre J, Podlaska A, Skoneczna A, Halas A, Sledziewska-Gojska E** (2006) Analysis of the spontaneous mutator phenotype associated with 20S proteasome deficiency in *S. cerevisiae*. *Mutat Res* **593**(1-2): 153-163
- Meaux S, van Hoof A, Baker KE** (2008) Nonsense-mediated mRNA decay in yeast does not require PAB1 or a poly(A) tail. *Mol Cell* **29**(1): 134-140
- Meiners S, Heyken D, Weller A, Ludwig A, Stangl K, Kloetzel PM, Kruger E** (2003) Inhibition of proteasome activity induces concerted expression of proteasome genes and de novo formation of Mammalian proteasomes. *J Biol Chem* **278**(24): 21517-21525
- Melo J, Toczyski D** (2002) A unified view of the DNA-damage checkpoint. *Curr Opin Cell Biol* **14**(2): 237-245
- Melo JA, Cohen J, Toczyski DP** (2001) Two checkpoint complexes are independently recruited to sites of DNA damage in vivo. *Genes Dev* **15**(21): 2809-2821
- Merker JD, Datta A, Kolodner RD, Petes TD** (2000) The yeast HSM3 gene is not involved in DNA mismatch repair in rapidly dividing cells. *Genetics* **154**(1): 491-493

Moldovan GL, Pfander B, Jentsch S (2007) PCNA, the maestro of the replication fork. *Cell* **129**(4): 665-679

Morgan DO (1997) Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol* **13**: 261-291

Morris MC, Kaiser P, Rudyak S, Baskerville C, Watson MH, Reed SI (2003) Cks1-dependent proteasome recruitment and activation of CDC20 transcription in budding yeast. *Nature* **423**(6943): 1009-1013

Morrison AJ, Kim JA, Person MD, Highland J, Xiao J, Wehr TS, Hensley S, Bao Y, Shen J, Collins SR, Weissman JS, Delrow J, Krogan NJ, Haber JE, Shen X (2007) Mec1/Tell1 phosphorylation of the INO80 chromatin remodeling complex influences DNA damage checkpoint responses. *Cell* **130**(3): 499-511

Mousson F, Ochsenbein F, Mann C (2007) The histone chaperone Asf1 at the crossroads of chromatin and DNA checkpoint pathways. *Chromosoma* **116**(2): 79-93

Mu JJ, Wang Y, Luo H, Leng M, Zhang J, Yang T, Besusso D, Jung SY, Qin J (2007) A proteomic analysis of ataxia telangiectasia-mutated (ATM)/ATM-Rad3-related (ATR) substrates identifies the ubiquitin-proteasome system as a regulator for DNA damage checkpoints. *J Biol Chem* **282**(24): 17330-17334

Mukhopadhyay D, Riezman H (2007) Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling. *Science* **315**(5809): 201-205

Murakami Y, Matsufuji S, Kameji T, Hayashi S, Igarashi K, Tamura T, Tanaka K, Ichihara A (1992) Ornithine decarboxylase is degraded by the 26S proteasome without ubiquitination. *Nature* **360**(6404): 597-599

Murakawa Y, Sonoda E, Barber LJ, Zeng W, Yokomori K, Kimura H, Niimi A, Lehmann A, Zhao GY, Hocheegger H, Boulton SJ, Takeda S (2007) Inhibitors of the proteasome suppress homologous DNA recombination in mammalian cells. *Cancer Res* **67**(18): 8536-8543

Murray AW (2004) Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell* **116**(2): 221-234

Nakada D, Matsumoto K, Sugimoto K (2003) ATM-related Tel1 associates with double-strand breaks through an Xrs2-dependent mechanism. *Genes Dev* **17**(16): 1957-1962

Nakamura TM, Du LL, Redon C, Russell P (2004) Histone H2A phosphorylation controls Crb2 recruitment at DNA breaks, maintains checkpoint arrest, and influences DNA repair in fission yeast. *Mol Cell Biol* **24**(14): 6215-6230

Nandi D, Woodward E, Ginsburg DB, Monaco JJ (1997) Intermediates in the formation of mouse 20S proteasomes: implications for the assembly of precursor beta subunits. *EMBO J* **16**(17): 5363-5375

Navas TA, Zhou Z, Elledge SJ (1995) DNA polymerase epsilon links the DNA replication machinery to the S phase checkpoint. *Cell* **80**(1): 29-39

- Navon A, Goldberg AL** (2001) Proteins are unfolded on the surface of the ATPase ring before transport into the proteasome. *Mol Cell* **8**(6): 1339-1349
- Nei M, Rooney AP** (2005) Concerted and birth-and-death evolution of multigene families. *Annu Rev Genet* **39**: 121-152
- Nishikawa H, Ooka S, Sato K, Arima K, Okamoto J, Klevit RE, Fukuda M, Ohta T** (2004) Mass spectrometric and mutational analyses reveal Lys-6-linked polyubiquitin chains catalyzed by BRCA1-BARD1 ubiquitin ligase. *J Biol Chem* **279**(6): 3916-3924
- Nurse P** (1975) Genetic control of cell size at cell division in yeast. *Nature* **256**(5518): 547-551
- Nussbaum AK, Dick TP, Keilholz W, Schirle M, Stevanovic S, Dietz K, Heinemeyer W, Groll M, Wolf DH, Huber R, Rammensee HG, Schild H** (1998) Cleavage motifs of the yeast 20S proteasome beta subunits deduced from digests of enolase 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(21): 12504-12509
- Nyberg KA, Michelson RJ, Putnam CW, Weinert TA** (2002) Toward maintaining the genome: DNA damage and replication checkpoints. *Annu Rev Genet* **36**: 617-656
- O'Connell BC, Harper JW** (2007) Ubiquitin proteasome system (UPS): what can chromatin do for you? *Curr Opin Cell Biol* **19**(2): 206-214
- O'Neill BM, Szyjka SJ, Lis ET, Bailey AO, Yates JR, 3rd, Aparicio OM, Romesberg FE** (2007) Pph3-Psy2 is a phosphatase complex required for Rad53 dephosphorylation and replication fork restart during recovery from DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(22): 9290-9295
- Ogura T, Wilkinson AJ** (2001) AAA+ superfamily ATPases: common structure--diverse function. *Genes Cells* **6**(7): 575-597
- Oliva-Trastoy M, Berthonaud V, Chevalier A, Ducrot C, Marsolier-Kergoat MC, Mann C, Leteurtre F** (2007) The Wip1 phosphatase (PPM1D) antagonizes activation of the Chk2 tumour suppressor kinase. *Oncogene* **26**(10): 1449-1458
- Orian A, Whiteside S, Israel A, Stancovski I, Schwartz AL, Ciechanover A** (1995) Ubiquitin-mediated processing of NF-kappa B transcriptional activator precursor p105. Reconstitution of a cell-free system and identification of the ubiquitin-carrier protein, E2, and a novel ubiquitin-protein ligase, E3, involved in conjugation. *J Biol Chem* **270**(37): 21707-21714
- Orlowski M, Wilk S** (2000) Catalytic activities of the 20 S proteasome, a multicatalytic proteinase complex. *Arch Biochem Biophys* **383**(1): 1-16
- Ortolan TG, Tongaonkar P, Lambertson D, Chen L, Schaubert C, Madura K** (2000) The DNA repair protein rad23 is a negative regulator of multi-ubiquitin chain assembly. *Nat Cell Biol* **2**(9): 601-608

Owsianik G, Balzi I L, Ghislain M (2002) Control of 26S proteasome expression by transcription factors regulating multidrug resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **43**(5): 1295-1308

Ozkaynak E, Finley D, Solomon MJ, Varshavsky A (1987) The yeast ubiquitin genes: a family of natural gene fusions. *EMBO J* **6**(5): 1429-1439

Ozkaynak E, Finley D, Varshavsky A (1984) The yeast ubiquitin gene: head-to-tail repeats encoding a polyubiquitin precursor protein. *Nature* **312**(5995): 663-666

Paciotti V, Clerici M, Lucchini G, Longhese MP (2000) The checkpoint protein Ddc2, functionally related to *S. pombe* Rad26, interacts with Mec1 and is regulated by Mec1-dependent phosphorylation in budding yeast. *Genes Dev* **14**(16): 2046-2059

Page MF, Carr B, Anders KR, Grimson A, Anderson P (1999) SMG-2 is a phosphorylated protein required for mRNA surveillance in *Caenorhabditis elegans* and related to Upf1p of yeast. *Mol Cell Biol* **19**(9): 5943-5951

Painter RB, Young BR (1980) Radiosensitivity in ataxia-telangiectasia: a new explanation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**(12): 7315-7317

Palmer A, Mason GG, Paramio JM, Knecht E, Rivett AJ (1994) Changes in proteasome localization during the cell cycle. *Eur J Cell Biol* **64**(1): 163-175

Paques F, Haber JE (1999) Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**(2): 349-404

Park Y, Hwang YP, Lee JS, Seo SH, Yoon SK, Yoon JB (2005) Proteasomal ATPase-associated factor 1 negatively regulates proteasome activity by interacting with proteasomal ATPases. *Mol Cell Biol* **25**(9): 3842-3853

Pasero P, Duncker BP, Schwob E, Gasser SM (1999) A role for the Cdc7 kinase regulatory subunit Dbf4p in the formation of initiation-competent origins of replication. *Genes Dev* **13**(16): 2159-2176

Pasero P, Shimada K, Duncker BP (2003) Multiple roles of replication forks in S phase checkpoints: sensors, effectors and targets. *Cell Cycle* **2**(6): 568-572

Patel SD, Monaco JJ, McDevitt HO (1994) Delineation of the subunit composition of human proteasomes using antisera against the major histocompatibility complex-encoded LMP2 and LMP7 subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(1): 296-300

Pati D, Keller C, Groudine M, Plon SE (1997) Reconstitution of a MEC1-independent checkpoint in yeast by expression of a novel human fork head cDNA. *Mol Cell Biol* **17**(6): 3037-3046

Paulovich AG, Hartwell LH (1995) A checkpoint regulates the rate of progression through S phase in *S. cerevisiae* in response to DNA damage. *Cell* **82**(5): 841-847

- Pelliccioli A, Foiani M** (2005) Signal transduction: how rad53 kinase is activated. *Curr Biol* **15**(18): R769-771
- Pelliccioli A, Lee SE, Lucca C, Foiani M, Haber JE** (2001) Regulation of *Saccharomyces* Rad53 checkpoint kinase during adaptation from DNA damage-induced G2/M arrest. *Mol Cell* **7**(2): 293-300
- Pelliccioli A, Lucca C, Liberi G, Marini F, Lopes M, Plevani P, Romano A, Di Fiore PP, Foiani M** (1999) Activation of Rad53 kinase in response to DNA damage and its effect in modulating phosphorylation of the lagging strand DNA polymerase. *EMBO J* **18**(22): 6561-6572
- Peng J, Schwartz D, Elias JE, Thoreen CC, Cheng D, Marsischky G, Roelofs J, Finley D, Gygi SP** (2003) A proteomics approach to understanding protein ubiquitination. *Nat Biotechnol* **21**(8): 921-926
- Peters JM, Cejka Z, Harris JR, Kleinschmidt JA, Baumeister W** (1993) Structural features of the 26 S proteasome complex. *J Mol Biol* **234**(4): 932-937
- Pickart CM, Cohen RE** (2004) Proteasomes and their kin: proteases in the machine age. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(3): 177-187
- Pickart CM, Eddins MJ** (2004) Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochim Biophys Acta* **1695**(1-3): 55-72
- Pike BL, Tennis N, Heierhorst J** (2004) Rad53 kinase activation-independent replication checkpoint function of the N-terminal forkhead-associated (FHA1) domain. *J Biol Chem* **279**(38): 39636-39644
- Piper RC, Katzmann DJ** (2007) Biogenesis and function of multivesicular bodies. *Annu Rev Cell Dev Biol* **23**: 519-547
- Plafker SM, Plafker KS, Weissman AM, Macara IG** (2004) Ubiquitin charging of human class III ubiquitin-conjugating enzymes triggers their nuclear import. *J Cell Biol* **167**(4): 649-659
- Prakash S, Tian L, Ratliff KS, Lehotzky RE, Matouschek A** (2004) An unstructured initiation site is required for efficient proteasome-mediated degradation. *Nat Struct Mol Biol* **11**(9): 830-837
- Qiu XB, Ouyang SY, Li CJ, Miao S, Wang L, Goldberg AL** (2006) hRpn13/ADRM1/GP110 is a novel proteasome subunit that binds the deubiquitinating enzyme, UCH37. *EMBO J* **25**(24): 5742-5753
- Raasi S, Pickart CM** (2003) Rad23 ubiquitin-associated domains (UBA) inhibit 26 S proteasome-catalyzed proteolysis by sequestering lysine 48-linked polyubiquitin chains. *J Biol Chem* **278**(11): 8951-8959
- Rabl J, Smith DM, Yu Y, Chang SC, Goldberg AL, Cheng Y** (2008) Mechanism of gate opening in the 20S proteasome by the proteasomal ATPases. *Mol Cell* **30**(3): 360-368

Ramos PC, Hockendorff J, Johnson ES, Varshavsky A, Dohmen RJ (1998) Ump1p is required for proper maturation of the 20S proteasome and becomes its substrate upon completion of the assembly. *Cell* **92**(4): 489-499

Ramos PC, Marques AJ, London MK, Dohmen RJ (2004) Role of C-terminal extensions of subunits beta2 and beta7 in assembly and activity of eukaryotic proteasomes. *J Biol Chem* **279**(14): 14323-14330

Rape M, Jentsch S (2004) Productive RUpture: activation of transcription factors by proteasomal processing. *Biochim Biophys Acta* **1695**(1-3): 209-213

Rechsteiner M, Hill CP (2005) Mobilizing the proteolytic machine: cell biological roles of proteasome activators and inhibitors. *Trends Cell Biol* **15**(1): 27-33

Redon C, Pilch DR, Rogakou EP, Orr AH, Lowndes NF, Bonner WM (2003) Yeast histone 2A serine 129 is essential for the efficient repair of checkpoint-blind DNA damage. *EMBO Rep* **4**(7): 678-684

Reed SH, Gillette TG (2007) Nucleotide excision repair and the ubiquitin proteasome pathway--do all roads lead to Rome? *DNA Repair (Amst)* **6**(2): 149-156

Rehwinkel J, Letunic I, Raes J, Bork P, Izaurralde E (2005) Nonsense-mediated mRNA decay factors act in concert to regulate common mRNA targets. *RNA* **11**(10): 1530-1544

Reits EA, Benham AM, Plougastel B, Neefjes J, Trowsdale J (1997) Dynamics of proteasome distribution in living cells. *EMBO J* **16**(20): 6087-6094

Richmond C, Gorbea C, Rechsteiner M (1997) Specific interactions between ATPase subunits of the 26 S protease. *J Biol Chem* **272**(20): 13403-13411

Rigaut G, Shevchenko A, Rutz B, Wilm M, Mann M, Seraphin B (1999) A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat Biotechnol* **17**(10): 1030-1032

Rinaldi T, Hofmann L, Gambadoro A, Cossard R, Livnat-Levanon N, Glickman MH, Frontali L, Delahodde A (2008) Dissection of the carboxyl-terminal domain of the proteasomal subunit rpn11 in maintenance of mitochondrial structure and function. *Mol Biol Cell* **19**(3): 1022-1031

Rivett AJ (1998) Intracellular distribution of proteasomes. *Curr Opin Immunol* **10**(1): 110-114

Rivett AJ, Bose S, Brooks P, Broadfoot KI (2001) Regulation of proteasome complexes by gamma-interferon and phosphorylation. *Biochimie* **83**(3-4): 363-366

Rock KL, Goldberg AL (1999) Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. *Annu Rev Immunol* **17**: 739-779

Rosenzweig R, Osmulski PA, Gaczynska M, Glickman MH (2008) The central unit within the 19S regulatory particle of the proteasome. *Nat Struct Mol Biol* **15**(6): 573-580

Rouse J, Jackson SP (2000) LCD1: an essential gene involved in checkpoint control and regulation of the MEC1 signalling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* **19**(21): 5801-5812

Rubin DM, Glickman MH, Larsen CN, Dhruvakumar S, Finley D (1998) Active site mutants in the six regulatory particle ATPases reveal multiple roles for ATP in the proteasome. *EMBO J* **17**(17): 4909-4919

Russell SJ, Reed SH, Huang W, Friedberg EC, Johnston SA (1999a) The 19S regulatory complex of the proteasome functions independently of proteolysis in nucleotide excision repair. *Mol Cell* **3**(6): 687-695

Russell SJ, Steger KA, Johnston SA (1999b) Subcellular localization, stoichiometry, and protein levels of 26 S proteasome subunits in yeast. *J Biol Chem* **274**(31): 21943-21952

Sabbioneda S, Minesinger BK, Giannattasio M, Plevani P, Muzi-Falconi M, Jinks-Robertson S (2005) The 9-1-1 checkpoint clamp physically interacts with polzeta and is partially required for spontaneous polzeta-dependent mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **280**(46): 38657-38665

Sacher M, Pfander B, Hoege C, Jentsch S (2006) Control of Rad52 recombination activity by double-strand break-induced SUMO modification. *Nat Cell Biol* **8**(11): 1284-1290

Sachs AB, Bond MW, Kornberg RD (1986) A single gene from yeast for both nuclear and cytoplasmic polyadenylate-binding proteins: domain structure and expression. *Cell* **45**(6): 827-835

Sachs AB, Deardorff JA (1992) Translation initiation requires the PAB-dependent poly(A) ribonuclease in yeast. *Cell* **70**(6): 961-973

Saeki Y, Sone T, Toh-e A, Yokosawa H (2002) Identification of ubiquitin-like protein-binding subunits of the 26S proteasome. *Biochem Biophys Res Commun* **296**(4): 813-819

Saeki Y, Tanaka K (2007) Unlocking the proteasome door. *Mol Cell* **27**(6): 865-867

Saeki Y, Toh-e A, Yokosawa H (2000) Rapid isolation and characterization of the yeast proteasome regulatory complex. *Biochem Biophys Res Commun* **273**(2): 509-515

Saito H, Tatebayashi K (2004) Regulation of the osmoregulatory HOG MAPK cascade in yeast. *J Biochem* **136**(3): 267-272

Sakata E, Yamaguchi Y, Kurimoto E, Kikuchi J, Yokoyama S, Yamada S, Kawahara H, Yokosawa H, Hattori N, Mizuno Y, Tanaka K, Kato K (2003) Parkin binds the Rpn10 subunit of 26S proteasomes through its ubiquitin-like domain. *EMBO Rep* **4**(3): 301-306

Salghetti SE, Caudy AA, Chenoweth JG, Tansey WP (2001) Regulation of transcriptional activation domain function by ubiquitin. *Science* **293**(5535): 1651-1653

Samanta MP, Liang S (2003) Predicting protein functions from redundancies in large-scale protein interaction networks. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(22): 12579-12583

Sambrook, Russell (2001) *Molecular Cloning, a laboratory manual*, Vol.3. CSHL Press, Cold Spring Harbor, New York.

Sanchez Y, Bachant J, Wang H, Hu F, Liu D, Tetzlaff M, Elledge SJ (1999) Control of the DNA damage checkpoint by chk1 and rad53 protein kinases through distinct mechanisms. *Science* **286**(5442): 1166-1171

Sanchez Y, Desany BA, Jones WJ, Liu Q, Wang B, Elledge SJ (1996) Regulation of RAD53 by the ATM-like kinases MEC1 and TEL1 in yeast cell cycle checkpoint pathways. *Science* **271**(5247): 357-360

Sandell LL, Zakian VA (1993) Loss of a yeast telomere: arrest, recovery, and chromosome loss. *Cell* **75**(4): 729-739

Sanders SL, Portoso M, Mata J, Bahler J, Allshire RC, Kouzarides T (2004) Methylation of histone H4 lysine 20 controls recruitment of Crb2 to sites of DNA damage. *Cell* **119**(5): 603-614

Santa Maria SR, Gangavarapu V, Johnson RE, Prakash L, Prakash S (2007) Requirement of Nse1, a subunit of the Smc5-Smc6 complex, for Rad52-dependent postreplication repair of UV-damaged DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **27**(23): 8409-8418

Santamaria PG, Finley D, Ballesta JP, Remacha M (2003) Rpn6p, a proteasome subunit from *Saccharomyces cerevisiae*, is essential for the assembly and activity of the 26 S proteasome. *J Biol Chem* **278**(9): 6687-6695

Santocanale C, Diffley JF (1998) A Mec1- and Rad53-dependent checkpoint controls late-firing origins of DNA replication. *Nature* **395**(6702): 615-618

Satoh K, Sasajima H, Nyomura KI, Yokosawa H, Sawada H (2001) Assembly of the 26S proteasome is regulated by phosphorylation of the p45/Rpt6 ATPase subunit. *Biochemistry* **40**(2): 314-319

Schauber C, Chen L, Tongaonkar P, Vega I, Lambertson D, Potts W, Madura K (1998) Rad23 links DNA repair to the ubiquitin/proteasome pathway. *Nature* **391**(6668): 715-718

Scheel H, Hofmann K (2005) Prediction of a common structural scaffold for proteasome lid, COP9-signalosome and eIF3 complexes. *BMC Bioinformatics* **6**: 71

Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM (1990) The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* **63**(6): 1129-1136

Schimke RT, Doyle D (1970) Control of enzyme levels in animal tissues. *Annu Rev Biochem* **39**: 929-976

Schmidt M, Haas W, Crosas B, Santamaria PG, Gygi SP, Walz T, Finley D (2005) The HEAT repeat protein Blm10 regulates the yeast proteasome by capping the core particle. *Nat Struct Mol Biol* **12**(4): 294-303

Schmidt M, Zantopf D, Kraft R, Kostka S, Preissner R, Kloetzel PM (1999) Sequence information within proteasomal prosequences mediates efficient integration of beta-subunits into the 20 S proteasome complex. *J Mol Biol* **288**(1): 117-128

Schmidtke G, Kraft R, Kostka S, Henklein P, Frommel C, Lowe J, Huber R, Kloetzel PM, Schmidt M (1996) Analysis of mammalian 20S proteasome biogenesis: the maturation of beta-subunits is an ordered two-step mechanism involving autocatalysis. *EMBO J* **15**(24): 6887-6898

Schmidtke G, Schmidt M, Kloetzel PM (1997) Maturation of mammalian 20 S proteasome: purification and characterization of 13 S and 16 S proteasome precursor complexes. *J Mol Biol* **268**(1): 95-106

Schreiner P, Chen X, Husnjak K, Randles L, Zhang N, Elsasser S, Finley D, Dikic I, Walters KJ, Groll M (2008) Ubiquitin docking at the proteasome through a novel pleckstrin-homology domain interaction. *Nature* **453**(7194): 548-552

Schwartz MF, Duong JK, Sun Z, Morrow JS, Pradhan D, Stern DF (2002) Rad9 phosphorylation sites couple Rad53 to the *Saccharomyces cerevisiae* DNA damage checkpoint. *Mol Cell* **9**(5): 1055-1065

Schwartz MF, Lee SJ, Duong JK, Eminaga S, Stern DF (2003) FHA domain-mediated DNA checkpoint regulation of Rad53. *Cell Cycle* **2**(4): 384-396

Seemuller E, Lupas A, Baumeister W (1996) Autocatalytic processing of the 20S proteasome. *Nature* **382**(6590): 468-471

Seemuller E, Lupas A, Stock D, Lowe J, Huber R, Baumeister W (1995) Proteasome from *Thermoplasma acidophilum*: a threonine protease. *Science* **268**(5210): 579-582

Sharma VM, Tomar RS, Dempsey AE, Reese JC (2007) Histone deacetylases RPD3 and HOS2 regulate the transcriptional activation of DNA damage-inducible genes. *Mol Cell Biol* **27**(8): 3199-3210

Sharon M, Taverner T, Ambroggio XI, Deshaies RJ, Robinson CV (2006a) Structural organization of the 19S proteasome lid: insights from MS of intact complexes. *PLoS Biol* **4**(8): e267

Sharon M, Witt S, Felderer K, Rockel B, Baumeister W, Robinson CV (2006b) 20S proteasomes have the potential to keep substrates in store for continual degradation. *J Biol Chem* **281**(14): 9569-9575

Sharon M, Witt S, Glasmacher E, Baumeister W, Robinson CV (2007) Mass spectrometry reveals the missing links in the assembly pathway of the bacterial 20 S proteasome. *J Biol Chem* **282**(25): 18448-18457

Sheaff RJ, Singer JD, Swanger J, Smitherman M, Roberts JM, Clurman BE (2000) Proteasomal turnover of p21Cip1 does not require p21Cip1 ubiquitination. *Mol Cell* **5**(2): 403-410

Shiloh Y (2003) ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer* **3**(3): 155-168

Sidorova JM, Breeden LL (1997) Rad53-dependent phosphorylation of Swi6 and down-regulation of CLN1 and CLN2 transcription occur in response to DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* **11**(22): 3032-3045

Siede W, Friedberg AS, Friedberg EC (1993) RAD9-dependent G1 arrest defines a second checkpoint for damaged DNA in the cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(17): 7985-7989

Simpson MV (1953) The release of labeled amino acids from the proteins of rat liver slices. *J Biol Chem* **201**(1): 143-154

Skoneczna A, McIntyre J, Skoneczny M, Policinska Z, Sledziwska-Gojska E (2007) Polymerase eta is a short-lived, proteasomally degraded protein that is temporarily stabilized following UV irradiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol* **366**(4): 1074-1086

Smith DM, Benaroudj N, Goldberg A (2006) Proteasomes and their associated ATPases: a destructive combination. *J Struct Biol* **156**(1): 72-83

Smith DM, Chang SC, Park S, Finley D, Cheng Y, Goldberg AL (2007) Docking of the proteasomal ATPases' carboxyl termini in the 20S proteasome's alpha ring opens the gate for substrate entry. *Mol Cell* **27**(5): 731-744

Smith DM, Kafri G, Cheng Y, Ng D, Walz T, Goldberg AL (2005) ATP binding to PAN or the 26S ATPases causes association with the 20S proteasome, gate opening, and translocation of unfolded proteins. *Mol Cell* **20**(5): 687-698

Smolka MB, Albuquerque CP, Chen SH, Schmidt KH, Wei XX, Kolodner RD, Zhou H (2005) Dynamic changes in protein-protein interaction and protein phosphorylation probed with amine-reactive isotope tag. *Mol Cell Proteomics* **4**(9): 1358-1369

Smolka MB, Chen SH, Maddox PS, Enserink JM, Albuquerque CP, Wei XX, Desai A, Kolodner RD, Zhou H (2006) An FHA domain-mediated protein interaction network of Rad53 reveals its role in polarized cell growth. *J Cell Biol* **175**(5): 743-753

Sogo JM, Lopes M, Foiani M (2002) Fork reversal and ssDNA accumulation at stalled replication forks owing to checkpoint defects. *Science* **297**(5581): 599-602

Somesh BP, Reid J, Liu WF, Sogaard TM, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Svejstrup JQ (2005) Multiple mechanisms confining RNA polymerase II ubiquitylation to polymerases undergoing transcriptional arrest. *Cell* **121**(6): 913-923

Sone T, Saeki Y, Toh-e A, Yokosawa H (2004) Sem1p is a novel subunit of the 26 S proteasome from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **279**(27): 28807-28816

Soulier J, Lowndes NF (1999) The BRCT domain of the *S. cerevisiae* checkpoint protein Rad9 mediates a Rad9-Rad9 interaction after DNA damage. *Curr Biol* **9**(10): 551-554

Spence J, Gali RR, Dittmar G, Sherman F, Karin M, Finley D (2000) Cell cycle-regulated modification of the ribosome by a variant multiubiquitin chain. *Cell* **102**(1): 67-76

Spence J, Sadis S, Haas AL, Finley D (1995) A ubiquitin mutant with specific defects in DNA repair and multiubiquitination. *Mol Cell Biol* **15**(3): 1265-1273

Stanhill A, Haynes CM, Zhang Y, Min G, Steele MC, Kalinina J, Martinez E, Pickart CM, Kong XP, Ron D (2006) An arsenite-inducible 19S regulatory particle-associated protein adapts proteasomes to proteotoxicity. *Mol Cell* **23**(6): 875-885

Steger DJ, Workman JL (1999) Transcriptional analysis of purified histone acetyltransferase complexes. *Methods* **19**(3): 410-416

Stern DF, Zheng P, Beidler DR, Zerillo C (1991) Spk1, a new kinase from *Saccharomyces cerevisiae*, phosphorylates proteins on serine, threonine, and tyrosine. *Mol Cell Biol* **11**(2): 987-1001

Stettler S, Chiannikulchai N, Hermann-Le Denmat S, Lalo D, Lacroute F, Sentenac A, Thuriaux P (1993) A general suppressor of RNA polymerase I, II and III mutations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **239**(1-2): 169-176

Strickland E, Hakala K, Thomas PJ, DeMartino GN (2000) Recognition of misfolding proteins by PA700, the regulatory subcomplex of the 26 S proteasome. *J Biol Chem* **275**(8): 5565-5572

Stucki M, Jackson SP (2006) gammaH2AX and MDC1: anchoring the DNA-damage-response machinery to broken chromosomes. *DNA Repair (Amst)* **5**(5): 534-543

Suchanek M, Radzikowska A, Thiele C (2005) Photo-leucine and photo-methionine allow identification of protein-protein interactions in living cells. *Nat Methods* **2**(4): 261-267

Sullivan A, Yuille M, Repellin C, Reddy A, Reelfs O, Bell A, Dunne B, Gusterson BA, Osin P, Farrell PJ, Yulug I, Evans A, Ozcelik T, Gasco M, Crook T (2002) Concomitant inactivation of p53 and Chk2 in breast cancer. *Oncogene* **21**(9): 1316-1324

Sun L, Deng L, Ea CK, Xia ZP, Chen ZJ (2004) The TRAF6 ubiquitin ligase and TAK1 kinase mediate IKK activation by BCL10 and MALT1 in T lymphocytes. *Mol Cell* **14**(3): 289-301

Sun Z, Fay DS, Marini F, Foiani M, Stern DF (1996) Spk1/Rad53 is regulated by Mec1-dependent protein phosphorylation in DNA replication and damage checkpoint pathways. *Genes Dev* **10**(4): 395-406

Sun Z, Hsiao J, Fay DS, Stern DF (1998) Rad53 FHA domain associated with phosphorylated Rad9 in the DNA damage checkpoint. *Science* **281**(5374): 272-274

Swaffield JC, Bromberg JF, Johnston SA (1992) Alterations in a yeast protein resembling HIV Tat-binding protein relieve requirement for an acidic activation domain in GAL4. *Nature* **357**(6380): 698-700

Sweeney FD, Yang F, Chi A, Shabanowitz J, Hunt DF, Durocher D (2005) *Saccharomyces cerevisiae* Rad9 acts as a Mec1 adaptor to allow Rad53 activation. *Curr Biol* **15**(15): 1364-1375

Tachikui H, Saitou N, Nakajima T, Hayasaka I, Ishida T, Inoue I (2003) Lineage-specific homogenization of the polyubiquitin gene among human and great apes. *J Mol Evol* **57**(6): 737-744

Takeda K, Yanagida M (2005) Regulation of nuclear proteasome by Rhp6/Ubc2 through ubiquitination and destruction of the sensor and anchor Cut8. *Cell* **122**(3): 393-405

Takeuchi J, Fujimuro M, Yokosawa H, Tanaka K, Toh-e A (1999) Rpn9 is required for efficient assembly of the yeast 26S proteasome. *Mol Cell Biol* **19**(10): 6575-6584

Takeuchi J, Tamura T (2004) Recombinant ATPases of the yeast 26S proteasome activate protein degradation by the 20S proteasome. *FEBS Lett* **565**(1-3): 39-42

Talcott B, Moore MS (1999) Getting across the nuclear pore complex. *Trends Cell Biol* **9**(8): 312-318

Tanahashi N, Murakami Y, Minami Y, Shimbara N, Hendil KB, Tanaka K (2000) Hybrid proteasomes. Induction by interferon-gamma and contribution to ATP-dependent proteolysis. *J Biol Chem* **275**(19): 14336-14345

Tanaka H, Arakawa H, Yamaguchi T, Shiraishi K, Fukuda S, Matsui K, Takei Y, Nakamura Y (2000) A ribonucleotide reductase gene involved in a p53-dependent cell-cycle checkpoint for DNA damage. *Nature* **404**(6773): 42-49

Tatebe H, Yanagida M (2000) Cut8, essential for anaphase, controls localization of 26S proteasome, facilitating destruction of cyclin and Cut2. *Curr Biol* **10**(21): 1329-1338

Tercero JA, Diffley JF (2001) Regulation of DNA replication fork progression through damaged DNA by the Mec1/Rad53 checkpoint. *Nature* **412**(6846): 553-557

Tercero JA, Longhese MP, Diffley JF (2003) A central role for DNA replication forks in checkpoint activation and response. *Mol Cell* **11**(5): 1323-1336

Thrower JS, Hoffman L, Rechsteiner M, Pickart CM (2000) Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J* **19**(1): 94-102

Toczyski DP, Galgoczy DJ, Hartwell LH (1997) CDC5 and CKII control adaptation to the yeast DNA damage checkpoint. *Cell* **90**(6): 1097-1106

Tone Y, Toh EA (2002) Nob1p is required for biogenesis of the 26S proteasome and degraded upon its maturation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* **16**(24): 3142-3157

Travesa A, Duch A, Quintana DG (2008) Distinct phosphatases mediate the deactivation of the DNA damage checkpoint kinase rad53. *J Biol Chem* **283**(25): 17123-17130

Trenz K, Smith E, Smith S, Costanzo V (2006) ATM and ATR promote Mre11 dependent restart of collapsed replication forks and prevent accumulation of DNA breaks. *EMBO J* **25**(8): 1764-1774

Uetz P, Giot L, Cagney G, Mansfield TA, Judson RS, Knight JR, Lockshon D, Narayan V, Srinivasan M, Pochart P, Qureshi-Emili A, Li Y, Godwin B, Conover D, Kalbfleisch T, Vijayadamodar G, Yang M, Johnston M, Fields S, Rothberg JM (2000) A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **403**(6770): 623-627

Unno M, Mizushima T, Morimoto Y, Tomisugi Y, Tanaka K, Yasuoka N, Tsukihara T (2002) The structure of the mammalian 20S proteasome at 2.75 Å resolution. *Structure* **10**(5): 609-618

Ustrell V, Hoffman L, Pratt G, Rechsteiner M (2002) PA200, a nuclear proteasome activator involved in DNA repair. *EMBO J* **21**(13): 3516-3525

Usui T, Ogawa H, Petrini JH (2001) A DNA damage response pathway controlled by Tel1 and the Mre11 complex. *Mol Cell* **7**(6): 1255-1266

van Nocker S, Sadis S, Rubin DM, Glickman M, Fu H, Coux O, Wefes I, Finley D, Vierstra RD (1996) The multiubiquitin-chain-binding protein Mcb1 is a component of the 26S proteasome in *Saccharomyces cerevisiae* and plays a nonessential, substrate-specific role in protein turnover. *Mol Cell Biol* **16**(11): 6020-6028

Varrin AE, Prasad AA, Scholz RP, Ramer MD, Duncker BP (2005) A mutation in Dbf4 motif M impairs interactions with DNA replication factors and confers increased resistance to genotoxic agents. *Mol Cell Biol* **25**(17): 7494-7504

Vaze MB, Pellicoli A, Lee SE, Ira G, Liberi G, Arbel-Eden A, Foiani M, Haber JE (2002) Recovery from checkpoint-mediated arrest after repair of a double-strand break requires Srs2 helicase. *Mol Cell* **10**(2): 373-385

Veaute X, Jeusset J, Soustelle C, Kowalczykowski SC, Le Cam E, Fabre F (2003) The Srs2 helicase prevents recombination by disrupting Rad51 nucleoprotein filaments. *Nature* **423**(6937): 309-312

Velichutina I, Connerly PL, Arendt CS, Li X, Hochstrasser M (2004) Plasticity in eucaryotic 20S proteasome ring assembly revealed by a subunit deletion in yeast. *EMBO J* **23**(3): 500-510

Venclovas C, Thelen MP (2000) Structure-based predictions of Rad1, Rad9, Hus1 and Rad17 participation in sliding clamp and clamp-loading complexes. *Nucleic Acids Res* **28**(13): 2481-2493

Verma R, Aravind L, Oania R, McDonald WH, Yates JR, 3rd, Koonin EV, Deshaies RJ (2002) Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. *Science* **298**(5593): 611-615

- Verma R, Chen S, Feldman R, Schieltz D, Yates J, Dohmen J, Deshaies RJ** (2000) Proteasomal proteomics: identification of nucleotide-sensitive proteasome-interacting proteins by mass spectrometric analysis of affinity-purified proteasomes. *Mol Biol Cell* **11**(10): 3425-3439
- Verma R, Deshaies RJ** (2000) A proteasome howdunit: the case of the missing signal. *Cell* **101**(4): 341-344
- Verma R, Oania R, Graumann J, Deshaies RJ** (2004) Multiubiquitin chain receptors define a layer of substrate selectivity in the ubiquitin-proteasome system. *Cell* **118**(1): 99-110
- Vialard JE, Gilbert CS, Green CM, Lowndes NF** (1998) The budding yeast Rad9 checkpoint protein is subjected to Mec1/Tel1-dependent hyperphosphorylation and interacts with Rad53 after DNA damage. *EMBO J* **17**(19): 5679-5688
- Vijay-Kumar S, Bugg CE, Cook WJ** (1987) Structure of ubiquitin refined at 1.8 Å resolution. *J Mol Biol* **194**(3): 531-544
- Vodermaier HC** (2004) APC/C and SCF: controlling each other and the cell cycle. *Curr Biol* **14**(18): R787-796
- Voges D, Zwickl P, Baumeister W** (1999) The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu Rev Biochem* **68**: 1015-1068
- Volker C, Lupas AN** (2002) Molecular evolution of proteasomes. *Curr Top Microbiol Immunol* **268**: 1-22
- Walters KJ, Kleijnen MF, Goh AM, Wagner G, Howley PM** (2002) Structural studies of the interaction between ubiquitin family proteins and proteasome subunit S5a. *Biochemistry* **41**(6): 1767-1777
- Walz J, Erdmann A, Kania M, Typke D, Koster AJ, Baumeister W** (1998) 26S proteasome structure revealed by three-dimensional electron microscopy. *J Struct Biol* **121**(1): 19-29
- Wang L, Mao X, Ju D, Xie Y** (2004) Rpn4 is a physiological substrate of the Ubr2 ubiquitin ligase. *J Biol Chem* **279**(53): 55218-55223
- Wang W, Cajigas IJ, Peltz SW, Wilkinson MF, Gonzalez CI** (2006) Role for Upf2p phosphorylation in *Saccharomyces cerevisiae* nonsense-mediated mRNA decay. *Mol Cell Biol* **26**(9): 3390-3400
- Waxman L, Fagan JM, Goldberg AL** (1987) Demonstration of two distinct high molecular weight proteases in rabbit reticulocytes, one of which degrades ubiquitin conjugates. *J Biol Chem* **262**(6): 2451-2457
- Weake VM, Workman JL** (2008) Histone ubiquitination: triggering gene activity. *Mol Cell* **29**(6): 653-663

- Weber PL, Brown SC, Mueller L** (1987) Sequential ^1H NMR assignments and secondary structure identification of human ubiquitin. *Biochemistry* **26**(23): 7282-7290
- Weinert TA, Hartwell LH** (1988) The RAD9 gene controls the cell cycle response to DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* **241**(4863): 317-322
- Weinert TA, Kiser GL, Hartwell LH** (1994) Mitotic checkpoint genes in budding yeast and the dependence of mitosis on DNA replication and repair. *Genes Dev* **8**(6): 652-665
- Weinreich M, Stillman B** (1999) Cdc7p-Dbf4p kinase binds to chromatin during S phase and is regulated by both the APC and the RAD53 checkpoint pathway. *EMBO J* **18**(19): 5334-5346
- Wendler P, Lehmann A, Janek K, Baumgart S, Enenkel C** (2004) The bipartite nuclear localization sequence of Rpn2 is required for nuclear import of proteasomal base complexes via karyopherin α and proteasome functions. *J Biol Chem* **279**(36): 37751-37762
- Whitby FG, Masters EI, Kramer L, Knowlton JR, Yao Y, Wang CC, Hill CP** (2000) Structural basis for the activation of 20S proteasomes by 11S regulators. *Nature* **408**(6808): 115-120
- Wilk S, Orlowski M** (1983) Evidence that pituitary cation-sensitive neutral endopeptidase is a multicatalytic protease complex. *J Neurochem* **40**(3): 842-849
- Wilkinson CR, Wallace M, Morphew M, Perry P, Allshire R, Javerzat JP, McIntosh JR, Gordon C** (1998) Localization of the 26S proteasome during mitosis and meiosis in fission yeast. *EMBO J* **17**(22): 6465-6476
- Wilkinson KD, Urban MK, Haas AL** (1980) Ubiquitin is the ATP-dependent proteolysis factor I of rabbit reticulocytes. *J Biol Chem* **255**(16): 7529-7532
- Wilson MA, Meaux S, van Hoof A** (2007) A genomic screen in yeast reveals novel aspects of nonstop mRNA metabolism. *Genetics* **177**(2): 773-784
- Wintrode PL, Makhatadze GI, Privalov PL** (1994) Thermodynamics of ubiquitin unfolding. *Proteins* **18**(3): 246-253
- Witt E, Zantopf D, Schmidt M, Kraft R, Kloetzel PM, Kruger E** (2000) Characterisation of the newly identified human Ump1 homologue POMP and analysis of LMP7(β 5i) incorporation into 20 S proteasomes. *J Mol Biol* **301**(1): 1-9
- Wolf DH, Hilt W** (2004) The proteasome: a proteolytic nanomachine of cell regulation and waste disposal. *Biochim Biophys Acta* **1695**(1-3): 19-31
- Wu X, Shell SM, Zou Y** (2005) Interaction and colocalization of Rad9/Rad1/Hus1 checkpoint complex with replication protein A in human cells. *Oncogene* **24**(29): 4728-4735
- Wysocki R, Javaheri A, Allard S, Sha F, Cote J, Kron SJ** (2005) Role of Dot1-dependent histone H3 methylation in G1 and S phase DNA damage checkpoint functions of Rad9. *Mol Cell Biol* **25**(19): 8430-8443

Xie Y, Varshavsky A (2001) RPN4 is a ligand, substrate, and transcriptional regulator of the 26S proteasome: a negative feedback circuit. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(6): 3056-3061

Xie Y, Varshavsky A (2002) UFD4 lacking the proteasome-binding region catalyses ubiquitination but is impaired in proteolysis. *Nat Cell Biol* **4**(12): 1003-1007

Xu P, Peng J (2008) Characterization of polyubiquitin chain structure by middle-down mass spectrometry. *Anal Chem* **80**(9): 3438-3444

Yan J, Jetten AM (2008) RAP80 and RNF8, key players in the recruitment of repair proteins to DNA damage sites. *Cancer Lett*

Yang H, Jeffrey PD, Miller J, Kinnucan E, Sun Y, Thoma NH, Zheng N, Chen PL, Lee WH, Pavletich NP (2002) BRCA2 function in DNA binding and recombination from a BRCA2-DSS1-ssDNA structure. *Science* **297**(5588): 1837-1848

Yang Y, Fruh K, Ahn K, Peterson PA (1995) In vivo assembly of the proteasomal complexes, implications for antigen processing. *J Biol Chem* **270**(46): 27687-27694

Yao R, Zhang Z, An X, Bucci B, Perlstein DL, Stubbe J, Huang M (2003) Subcellular localization of yeast ribonucleotide reductase regulated by the DNA replication and damage checkpoint pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(11): 6628-6633

Yao T, Cohen RE (2002) A cryptic protease couples deubiquitination and degradation by the proteasome. *Nature* **419**(6905): 403-407

Yao Y, Toth CR, Huang L, Wong ML, Dias P, Burlingame AL, Coffino P, Wang CC (1999) alpha5 subunit in Trypanosoma brucei proteasome can self-assemble to form a cylinder of four stacked heptamer rings. *Biochem J* **344 Pt 2**: 349-358

Yashiroda H, Mizushima T, Okamoto K, Kameyama T, Hayashi H, Kishimoto T, Niwa S, Kasahara M, Kurimoto E, Sakata E, Takagi K, Suzuki A, Hirano Y, Murata S, Kato K, Yamane T, Tanaka K (2008) Crystal structure of a chaperone complex that contributes to the assembly of yeast 20S proteasomes. *Nat Struct Mol Biol* **15**(3): 228-236

Yen HC, Gordon C, Chang EC (2003) Schizosaccharomyces pombe Int6 and Ras homologs regulate cell division and mitotic fidelity via the proteasome. *Cell* **112**(2): 207-217

Yoo HY, Kumagai A, Shevchenko A, Dunphy WG (2004) Adaptation of a DNA replication checkpoint response depends upon inactivation of Claspin by the Polo-like kinase. *Cell* **117**(5): 575-588

Zhang M, Pickart CM, Coffino P (2003) Determinants of proteasome recognition of ornithine decarboxylase, a ubiquitin-independent substrate. *EMBO J* **22**(7): 1488-1496

Zhang XD, Matunis MJ (2005) Ub in charge: regulating E2 enzyme nuclear import. *Nat Cell Biol* **7**(1): 12-14

Zhang YW, Otterness DM, Chiang GG, Xie W, Liu YC, Mercurio F, Abraham RT (2005) Genotoxic stress targets human Chk1 for degradation by the ubiquitin-proteasome pathway. *Mol Cell* **19**(5): 607-618

- Zhang Z, Clawson A, Rechsteiner M** (1998) The proteasome activator 11 S regulator or PA28. Contribution By both alpha and beta subunits to proteasome activation. *J Biol Chem* **273**(46): 30660-30668
- Zhao X, Chabes A, Domkin V, Thelander L, Rothstein R** (2001) The ribonucleotide reductase inhibitor Sml1 is a new target of the Mec1/Rad53 kinase cascade during growth and in response to DNA damage. *EMBO J* **20**(13): 3544-3553
- Zhao X, Muller EG, Rothstein R** (1998) A suppressor of two essential checkpoint genes identifies a novel protein that negatively affects dNTP pools. *Mol Cell* **2**(3): 329-340
- Zhao X, Rothstein R** (2002) The Dun1 checkpoint kinase phosphorylates and regulates the ribonucleotide reductase inhibitor Sml1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(6): 3746-3751
- Zheng P, Fay DS, Burton J, Xiao H, Pinkham JL, Stern DF** (1993) SPK1 is an essential S-phase-specific gene of *Saccharomyces cerevisiae* that encodes a nuclear serine/threonine/tyrosine kinase. *Mol Cell Biol* **13**(9): 5829-5842
- Zhou BB, Elledge SJ** (2000) The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* **408**(6811): 433-439
- Zhou H, Wertz I, O'Rourke K, Ultsch M, Seshagiri S, Eby M, Xiao W, Dixit VM** (2004) Bcl10 activates the NF-kappaB pathway through ubiquitination of NEMO. *Nature* **427**(6970): 167-171
- Zhou Z, Elledge SJ** (1993) DUN1 encodes a protein kinase that controls the DNA damage response in yeast. *Cell* **75**(6): 1119-1127
- Ziv Y, Bielopolski D, Galanty Y, Lukas C, Taya Y, Schultz DC, Lukas J, Bekker-Jensen S, Bartek J, Shiloh Y** (2006) Chromatin relaxation in response to DNA double-strand breaks is modulated by a novel ATM- and KAP-1 dependent pathway. *Nat Cell Biol* **8**(8): 870-876
- Zou L, Cortez D, Elledge SJ** (2002) Regulation of ATR substrate selection by Rad17-dependent loading of Rad9 complexes onto chromatin. *Genes Dev* **16**(2): 198-208
- Zou L, Elledge SJ** (2003) Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science* **300**(5625): 1542-1548
- Zuhl F, Tamura T, Dolenc I, Cejka Z, Nagy I, De Mot R, Baumeister W** (1997) Subunit topology of the Rhodococcus proteasome. *FEBS Lett* **400**(1): 83-90
- Zwickl P, Klein J, Baumeister W** (1994) Critical elements in proteasome assembly. *Nat Struct Biol* **1**(11): 765-770
- Zwickl P, Ng D, Woo KM, Klenk HP, Goldberg AL** (1999) An archaeobacterial ATPase, homologous to ATPases in the eukaryotic 26 S proteasome, activates protein breakdown by 20 S proteasomes. *J Biol Chem* **274**(37): 26008-26014

REMERCIEMENTS

Remerciements

Ça a commencé comme ça. Par une année blanche post-canadienne, à me demander et maintenant ?, avant de succomber de nouveau à l'appel discret de la biologie. Un jour de juin, au bout d'une matinée riche en transports publics et en degrés Celsius, me voilà donc au Commissariat à l'Energie Atomique de Saclay, à regarder ces lieux anonymes en essayant de les habiter, comme on visite une nouvelle maison. A me dire que je me plairais bien ici. Que les prises de sang annuelles sont sûrement une légende, pour dissuader les gens de pénétrer sur le site. Qu'il faudrait peut-être que je déménage, aussi, car c'est quand même loin de Saint-Leu-la-Forêt, le CEA.

Je n'ai pas déménagé, mais je me suis plu ici, infiniment. Malgré les prélèvements sanguins et les sous-investissements chroniques dans les transports en commun. Grâce aux autres, à tous ceux rencontrés au cours de ces quatre années de thèse. Des modèles et des maîtres, des collègues et des amis ; quelques repoussoirs, aussi. *Des miracles et des monstres*. Avanti !

Anne. Tu m'as formé et tu m'as fait confiance. Tu m'as laissé libre tout en m'évitant les errements. Tu as toujours été disponible, concernée, impliquée. Tu es mon maître-étalon scientifique et le guide idéal. Merci pour ces 4 années étincelantes.

Bénédicte. Une partenaire de tous les jours, une amie. Du théâtre à la randonnée, des goûts communs et partagés, une complicité qui me manque déjà mais que nous saurons prolonger, j'en suis certain. Merci d'avoir été là, toujours.

Régis. A la loupe ou même au microscope, quelqu'un de formidable. Bien plus qu'un collègue et un compagnon de marche dans la féerie vertacorienne. Des souvenirs gravés à jamais.

Marie-Claude. Des yeux bleus tournés vers l'horizon, que tout intéresse. Des discussions partagées autour de 3 desserts pour avoir le temps, et une conversion enthousiaste à Springsteen. Can you ask for more ?

Emilie. Inaltérable, un roc de raison et de gentillesse. Je vais longtemps regretter l'asile de ta paillasse lors de la rédaction, les minutes de répit volées avec ta complicité. Je t'ai connue Ma mais te voilà Caudy – je te souhaite donc un futur caudy-gnifique !

Noëlle la bien nommée. Un cadeau trouvé – mais est-ce vraiment surprenant ? – à côté d'une hotte. Une gentillesse et une écoute démesurées, des déjeuners incroyables et précieux. Mes doigts restent croisés, pour toi et Stéphane.

Manel. 2 années seulement passées du même côté de l'Atlantique, mais si riches en échanges, débats et moments de furieuse complicité que je jurerais que tu as été présent tout au long de ma thèse. Te voilà de retour – the best is yet to come.

Céline. Quelques lignes me paraissent bien peu pour résumer le plaisir que j'ai eu à te côtoyer chaque jour au laboratoire. D'une infinie sensibilité, tu as toujours été présente pour écouter, guider, rassurer, avec élégance et discrétion. Une myriade de moments magiques, depuis le rocher de la presqu'île de Giens jusqu'au rocher Suchard. Mais chut...

Etienne. Des conseils éclairés, des discussions enlevées, un altruisme rare et un engagement permanent. Merci de livrer ce combat pas si ordinaire.

Merci à Raphaël pour sa gentillesse, sa compétence, sa pédagogie et sa confiance, à Françoise, Fatma et Brice pour leur aide et leur implication dans les projets du laboratoire.

Merci à tous les membres du LC3/GEMSA/LMARGe avec qui j'ai partagé déjeuners et réunions, petits et grands moments, compagnons embarqués sur l'océan pas toujours pacifique de la recherche : François (conseiller avisé et ultime rempart contre une nuit au CEA), Arach (premier supporter au cours de la rédaction et partageur de houblon quand le RER s'attardait en chemin), Angélique (qui m'a si souvent galvanisé, et que j'espère un jour accompagner dans ces montagnes dont tu m'as dit tant de bien), Willy (un des plus cools – plein de choses pour la suite), Alexandra (la représentante dont la Suisse a toujours rêvé), Erwann (un breton qui fait aimer la Réunion au moins autant qu'une Miss), Alexandre (meet me tonight in Atlantic City !), Véronique, Jean-Yves, Ghislaine, Anne C, Thibault et Aurélie.

Merci à tous ceux du 144 (et aux quelques du 142) dont j'ai croisé, parfois trop peu, parfois trop tard, le chemin : Nayla (tiens fermement le cap, et que le vent te porte là où tu le souhaites), Emmanuel Godat (continuons la luvuutte !), Sandro (obrigado, Dom Juan !), Vivienne (London, beer and rock n'roll !), Simon, Chitranchu, Cécile, Gwenaëlle, Nathalie, Nicolas, Grégori, Céline B, Béatrice, Yad, Arounie, Magali, Géraldine, Julie, Marie, Pascal, Olivier, Christian, Sylvie (tu y arriveras, j'en suis sûr), Nazif, Sabrina, Arnaud, et bien sûr Camille, Fred, Cyril, Emmanuelle et Hocine, les piliers du TGIF, sans oublier Manu, Chantal, Gisèle, Catherine, Yolande, Linda et, last but not least, Arlette.

Merci aux compagnons de bus et de RER, en particulier Juan-Carlos (¡ Viva Villa !), Sofia et Roger, et aux musiques fortuites de la SNCF.

Merci à tous les membres du P. Lee's lab pour ces 9 mois inoubliés : Tommy T, Duncan « Browseman », Mike « Black ! », Kensuke « Chin-chin » Hirasawa, JB « Let's go to BK » McIntyre, Kara Norman, Andao (I will always love you), Ewa, Zhao, Megan et Melissa. Go Flames go !

Merci aux membres du jury, Pr Rosine Haguenauer-Tsapis, Dr Olivier Coux, Pr Giuseppe Baldacci, Pr Claudie-Lamour-Isnard, Dr Agnès Delahodde, Dr Carl Mann, d'avoir accepté d'évaluer le travail réalisé au cours de mon doctorat, et d'avoir contribué à transformer un moment que je redoutais en souvenirs délicieux.

Merci à l'Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC) d'avoir financé ma quatrième année de thèse. Sans elle je ne serai pas là. Littéralement.

Merci au Dr Jacquier pour son aide et ses nombreux conseils lors de la réalisation du crible, ainsi qu'au Dr Yves Ambroise pour la mise au point des tests d'activités protéolytiques.

Merci à Patrick Declerck, sans qui pas de sans qui (entre autres), à Vonvon et Alain pour votre refuge antonien.

A mes parents, mes frères et ma sœur, merci pour votre soutien indéfectible, merci pour tout.

Résumé

Les checkpoints de l'ADN coordonnent les réponses cellulaires aux dommages de l'ADN et au blocage de la réplication des cellules eucaryotes. Chez *Saccharomyces cerevisiae*, la protéine kinase Rad53 occupe une place centrale au sein des checkpoints de l'ADN. Afin d'identifier de nouveaux partenaires de Rad53, une approche génétique a été développée, utilisant l'allèle dominant létal *RAD53-DL* qui déclenche constitutivement des réponses cellulaires normalement induites par des lésions de l'ADN. Notre hypothèse est que l'absence des activateurs ou des substrats de Rad53 pourrait rétablir la croissance. Nous avons donc recherché, à l'échelle du génome de *S. cerevisiae*, les gènes qui suppriment la toxicité de *RAD53-DL* lorsqu'ils sont inactivés. 110 gènes ont été isolés et classés en groupes fonctionnels. Un groupe a particulièrement retenu notre attention. Il est composé de huit gènes dont l'inactivation confère à la cellule une hyper-résistance à plusieurs stress génotoxiques. Trois de ces gènes codent des composants du protéasome 26S, l'enzyme central du système de dégradation ubiquitine-dépendante des protéines qui joue un rôle crucial dans la plupart des processus cellulaires. Le protéasome est une structure macromoléculaire très sophistiquée composée d'une partie catalytique, la particule 20S, associée au complexe régulateur 19S, lui-même formé de 2 sous-complexes, la base et le couvercle. Son assemblage comprend de nombreuses étapes ordonnées. Au moment du crible, un seul chaperon du protéasome était connu chez la levure, la protéine Ump1, impliquée dans les étapes finales de maturation du protéasome 20S. Par des analyses génétiques et biochimiques, nous avons caractérisé les cinq autres membres du groupe fonctionnel « protéasome », dont la fonction était jusqu'alors inconnue. Les gènes *YLR021W*, *YPL144W*, *YLR199C* et *YKL206C*, que nous avons baptisés *POC1-4* (Protéasome Chaperone), codent 4 protéines formant deux paires de chaperons du protéasome 20S (Poc1-Poc2 et Poc3-Poc4) agissant en amont de Ump1. *HSM3* code la première protéine chaperonne de la particule régulatrice du protéasome. Hsm3 s'associe avec la base du 19S et assiste son assemblage. Son rôle est également de réguler l'association du 19S en formation avec le protéasome 20S. Nous avons identifié les homologues mammifères de Poc1-4 (PAC1-4) et Hsm3 (S5b), mettant ainsi en lumière une conservation remarquable des facteurs d'assemblage du protéasome au cours de l'évolution.

Mot-clés : Rad53, checkpoints, dommages de l'ADN, hyper-résistance, protéasome, assemblage, chaperon, Ump1, Poc, PAC, Hsm3, S5b.